



NARJARA FONSECA CANTELMO

**AMOSTRAGEM SISTEMÁTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FLUXO
GÊNICO E MÉTODOS DE DETECÇÃO DE EVENTOS
TRANSGÊNICOS EM MILHO**

**LAVRAS – MG
2012**

NARJARA FONSECA CANTELMO

**AMOSTRAGEM SISTEMÁTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FLUXO
GÊNICO E MÉTODOS DE DETECÇÃO DE EVENTOS
TRANSGÊNICOS EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Renzo Garcia Von Pinho

Coorientador

Dra. Édila Resende Vilela Von Pinho

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Cantelmo, Narjara Fonseca.

Amostragem sistemática para determinação de fluxo gênico e métodos de detecção de eventos transgênicos em milho / Narjara Fonseca Cantelmo. – Lavras : UFLA, 2012.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Renzo Garcia Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Contaminação. 3. Híbridos transgênicos. 4. PCR. 5. Teste de tiras imunocromatográficas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.1523

NARJARA FONSECA CANTELMO

**AMOSTRAGEM SISTEMÁTICA PARA DETERMINAÇÃO DE FLUXO
GÊNICO E MÉTODOS DE DETECÇÃO DE EVENTOS
TRANSGÊNICOS EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 13 de Setembro de 2012

Dra. Édila Resende Vilela Von Pinho UFLA

Dra. Luciane Vilela Resende UFLA

Dr. Renato Ribeiro de Lima UFLA

Dr. Renzo Garcia Von Pinho

Orientador

**LAVRAS – MG
2012**

*Aos meus pais, Cidinha e Helder, pelo apoio, exemplo e ajuda. Sem eles nada
disso seria possível.*

A minha filha, Maria Antônia, pela compreensão, amor e carinho.

*Ao meu marido, Luciano, pelo amor, por caminhar ao meu lado e por sempre
torcer pelas minhas vitórias.*

Aos meus amigos, pela força e pelo apoio.

Aos meus familiares, pela torcida e amizade.

*A Deus, por me dar o dom da vida e por colocar pessoas especiais em meu
caminho,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e, em especial, ao Departamento de Agricultura, pela possibilidade de realizar o mestrado.

Ao professor Renzo Garcia Von Pinho, pela orientação, os ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

À professora Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela coorientação e o exemplo de competência.

Ao professor Daniel Furtado Ferreira, pela amizade e disposição em me ajudar.

À Capes, pela bolsa de mestrado que me foi concedida.

Aos alunos de iniciação científica, que me ajudaram de alguma forma durante a condução do trabalho. Em especial, a Micaela e Iolanda, pela dedicação e disponibilidade.

Ao Grupo do Milho, pelo convívio e aprendizagem.

Às amigas de caminhada da pós-graduação, em especial Juliana Joice, Juliana Victor, Juliana Stracieri, Marcella Nunes, Marcela Carvalho Lígia, Lidiane, Luciana, Pollyana, Tatiana e Wiara.

A todos os amigos que sempre estiveram presentes em minha vida, especialmente Larissa, Cynthia e Bianca.

Aos funcionários e professores do Setor de Sementes, em especial dona Elza, Wilder e Walbert, e Marli, secretária da pós-graduação, pelo suporte.

À pós-doutora Vivian Elias Nascimento, pela paciência e pelos ensinamentos.

RESUMO

O primeiro evento transgênico de milho foi liberado no Brasil no ano de 2007 e, em 2012, já são 18 eventos transgênicos desta espécie liberados, com área plantada de, aproximadamente, 9,91 milhões de hectares, em 2011. No presente trabalho objetivou-se a determinação do fluxo gênico entre híbridos transgênicos e convencionais de milho utilizando a amostragem sistemática, bem como a determinação de um tamanho de amostra eficiente para a estimação desse fluxo. Objetivou-se também a avaliação de métodos de detecção de eventos transgênicos na cultura do milho, como a tira imunocromatográfica e a PCR convencional. As amostras para estudo de fluxo gênico foram coletadas em campos de produção de grãos nos municípios de Itumirim e Madre de Deus, na safra 2010/2011 e de Ingaí, na safra 2011/2012, todos localizados no estado de Minas Gerais. Foram coletadas amostras de quatro tamanhos diferentes e em cinco distâncias do campo convencional em relação ao campo transgênico. As amostras foram submetidas a análises de PCR em tempo real para a quantificação do fluxo gênico. Para a avaliação dos métodos de detecção de transgênicos pelo teste de tiras imunocromatográficas, foram utilizadas sementes de milho dos eventos transgênicos Herculex, Round Up Ready e VTPro, com os níveis de contaminação variando de 0,2% a 1,6%. Também foram analisadas, por meio de PCR convencional, amostras com cinco níveis de contaminação: 0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0% e 10%. No estudo do fluxo gênico utilizando a amostragem sistemática observou-se que não houve diferença estatística entre os tamanhos de amostras e as contaminações médias com transgênicos observadas foram inferiores ao limite de 1%. No teste de tira imunocromatográfica foi possível avaliar a expressão de proteínas em níveis de contaminação de 0,2%. No PCR convencional, foi possível detectar o evento Herculex em amostras com 1% de contaminação.

Palavras-Chave: PCR. Transgênico. Detecção.

ABSTRACT

The first transgenic maize event was released in Brazil in 2007 and 2012 already are 18 transgenic maize event released, with a planted area of approximately 9.91 million of hectares in 2011. The present study aimed to determine the gene flow among transgenic and conventional hybrid of maize using systematic sampling, as well as the determination of an effective sample size for this flow estimation. This study also objective the evaluation of transgenic maize event detection methods, as the lateral flow membrane strips and the conventional PCR. The samples for the gene flow study were collected in fields of grain production in the Itumirim and Madre de Deus municipalities, in the 2010/2011 crop and Ingaí in the 2011/2012 crop, all located in the Minas Gerais state. Samples were collected from four different sizes and five distances from the conventional field compared to transgenic field. The samples were analyzed using real-time PCR for gene flow quantification. To evaluate the detection methods by the lateral flow membrane strips were used corn seeds of transgenic events Herculex, Round Up Ready and VTPro with contamination levels ranging from 0.2% to 1.6%. Also were analyzed, using conventional PCR, samples with five contamination levels: 0.1%, 0.5%, 1.0%, 5.0% and 10%. In the study of gene flow used the systematic sampling observed that there was no statistical difference among the samples sizes, and the average contamination with transgenic observed were below to the limit of 1%. In the lateral flow membrane strip test was possible to evaluate the expression of proteins in contamination levels of 0.2%. In conventional PCR, it was possible to detect 1% of contamination in the Herculex samples.

Key words: PCR. Transgenic. Detection.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Transgênicos no Brasil e no mundo	12
2.2	Fluxo gênico	15
2.3	Coexistência	17
2.4	Marcadores moleculares	20
2.5	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR	21
2.6	Amostragem sistemática	23
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 2 Análise do fluxo gênico em milho sob diferentes tamanhos de amostras e distâncias de amostragem	32
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Amostragem sistemática	37
2.2	PCR em tempo real	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1	Itumirim safra 2010/2011	43
3.2	Madre de Deus, safra 2010/2011	45
3.3	Ingaí, safra 2011/2012	48
3.4	Análise conjunta	52
4	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	CAPÍTULO 3 Detecção de eventos transgênicos de milho por meio do teste de tiras imunocromatográficas e do PCR convencional	59
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	Teste de tiras imunocromatográficas	65

2.2	PCR multiplex	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1	Teste de tiras imunocromatográficas	69
3.2	PCR multiplex	71
	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

As últimas décadas foram de intensa revolução na agricultura mundial. A engenharia genética possibilitou, com a técnica do DNA recombinante, importantes avanços no melhoramento genético de várias culturas, devido à combinação de genes entre diferentes espécies de organismos, obtendo-se, assim, as plantas geneticamente modificadas.

Atualmente, no Brasil, existem vários eventos transgênicos liberados comercialmente para as culturas da soja, milho, algodão e feijão, que conferem tolerância a herbicidas e resistência a insetos e vírus. Para a cultura do milho, atualmente, no país, existem 18 eventos liberados comercialmente e muitos outros que aguardam a liberação comercial. Dentre os eventos liberados na cultura do milho, a maioria está associada à resistência a insetos, como os milhos MON810 e MON89034, da empresa Monsanto do Brasil; BT11, MIR162 e GA21, da empresa Syngenta Seeds; T25, da empresa Bayer Crop Science e HX, da empresa Down Agroscience (Brasil, 2012).

Após a liberação dos eventos para a comercialização é necessário que a empresa submeta à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) um plano de monitoramento pós-liberação comercial ou solicite sua isenção, no prazo de trinta dias, contados a partir da publicação do deferimento do pedido de liberação comercial do OGM, em consonância com a avaliação de risco da CTNBio, bem como com o parecer contido na sua decisão técnica (Brasil, 2011). Caso a isenção não seja concedida, deve ser realizado o monitoramento baseado nos diferentes impactos ambientais dos produtos, devendo um desses estudos ser relacionado ao fluxo gênico. Os resultados desses monitoramentos devem ser enviados anualmente a CTNBio, com os dados obtidos em diferentes regiões do país. Nesses monitoramentos uma das dificuldades relacionadas ao

estudo de fluxo gênico é a determinação do tamanho da amostra e do tipo de amostragem que deve ser utilizado para se ter precisão das estimativas obtidas.

Por meio do Decreto nº 4.680, de abril de 2003, que regulamentou a Lei nº 8.078, de setembro de 1990, passou-se a exigir a rotulação dos produtos que contenham mais de 1% de traços de transgênicos. Estudos relacionados à amostragem, incluindo a determinação do método de amostragem, o tamanho da amostra, assim como a distância de coleta das amostras, podem viabilizar as fiscalizações nos campos de produção pelos órgãos federais e estaduais pertinentes, facilitar o trabalho de monitoramento pelas empresas produtoras de sementes, quando necessário, e facilitar a determinação do nível de contaminação de lotes de grãos para fins de comercialização.

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, a determinação do fluxo gênico em função dos diferentes tamanhos de amostras e distâncias de amostragem, utilizando a amostragem sistemática. Foi avaliada, ainda, a eficiência de dois métodos de detecção de transgênicos em milho, o de tira imunocromatográfica e a PCR convencional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transgênicos no Brasil e no mundo

Hoje, organismos geneticamente modificados de várias espécies, como soja, milho, algodão, cana-de-açúcar, canola, mamão e feijão, entre outras, vêm sendo estudados. Em milho, no Brasil, atualmente, existem 11 eventos aprovados para a comercialização.

O melhoramento genético convencional em milho é o principal método utilizado para a produção de novos híbridos. Porém, os avanços da biotecnologia e da engenharia genética tornaram-se ferramentas importantes a serem utilizadas no melhoramento da cultura e, aliados, proporcionam importantes ganhos na seleção de indivíduos superiores (Aylor et al., 2003)

Na América Latina, pesquisas científicas têm sido desenvolvidas em grande escala no que se refere à produção de plantas transgênicas, em praticamente todos os países (Monquero, 2005).

O primeiro evento transgênico de milho liberado comercialmente no Brasil se deu no ano de 2007, com a aprovação do evento T25, com nome comercial Liberty Link, da empresa Bayer S.A., que apresenta, integrado em seu genoma, o gene *pat*, responsável pela síntese da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que catalisa a conversão de L-fosfinotricina (glufosinato de amônio) a produtos não tóxicos, inativando o ingrediente ativo e, desse modo, conferindo à planta a característica de tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Como consequência, plantas do referido evento de transformação são resistentes ao herbicida, permitindo seu emprego no controle de plantas invasoras (Brasil, 2007). Depois da liberação do primeiro evento de milho no Brasil, abriu-se precedente para várias outras liberações: MON810 (resistente a insetos), MON89034 (resistente a insetos) e NK603 (tolerante a glifosato), da

empresa Monsanto do Brasil; BT11(resistência a insetos e tolerância ao glufosinato de amônia), MIR162 (resistência a insetos) e GA21 (tolerante a glifosato), da empresa Syngenta Seeds; T25 (tolerância ao glufosinato de amônio), da empresa Bayer Crop Science e HX (resistência a insetos e tolerância ao glufosinato de amônio), da empresa Down Agrosience (Brasil, 2012).

O mundo vem passando por mais uma revolução na agricultura, com a descoberta de vários recursos genéticos que visam aumentar e melhorar a eficiência agrícola para atender à crescente demanda por alimentos. Esta vem sendo considerada a terceira grande revolução tecnológica no mundo, depois da Revolução Industrial e da revolução dos computadores (Shelton et al., 2002)

Assim, cada vez mais agricultores, em todo o mundo, vêm adotando a tecnologia dos transgênicos, vislumbrando os ganhos em produtividade, bem como a redução do uso de agrotóxicos e no custo de produção.

A adoção dessa tecnologia tem sido aumentada nos últimos anos. Em 2011, cem milhões de agricultores, em 29 países, adotaram a tecnologia e plantaram uma área de 1,25 bilhões de hectares com culturas transgênicas (James, 2012). Até o ano de 2015 espera-se que o número de países que irão aderir à biotecnologia seja de quarenta (James, 2010).

No ano de 2011, houve crescimento de 12 milhões de hectares plantados com transgênicos no mundo, com 160 milhões de hectares contra 148 milhões de hectares em 2010, com crescimento em torno de 8% da adoção da tecnologia pelos agricultores (James, 2012).

O cenário de crescimento da adoção da tecnologia não poderia ser diferente no Brasil, que é o segundo país do mundo em área plantada com OGM. Em 2011, foram cultivados, no Brasil, 30,3 milhões de hectares de lavouras transgênicas, com crescimento de 20% em relação a 2010, confirmando seu lugar no ranking dos países que mais utilizam a tecnologia dos organismos geneticamente modificados, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que

cultivaram 69 milhões de hectares. Dos 30,3 milhões de hectares de lavouras com OGM no Brasil, 9,91 milhões foram cultivados com milho, o que correspondeu a 64,9% de toda área plantada com essa cultura no país (James, 2012).

A adoção da tecnologia pelos agricultores se deve, em grande parte, à comodidade e à redução de custos, proporcionadas pelos materiais geneticamente modificados. Segundo pesquisas da empresa Celeres® (2010), entre os anos de 2009/10 a 2018/19, os agricultores brasileiros esperam gerar 30,4 bilhões de dólares de benefícios econômicos diretos, devido à adoção do milho GM, pela redução do uso de agrotóxicos, combustível e água, sendo esses agricultores os mais beneficiados com adoção da biotecnologia.

A adoção de transgênicos, em 2010, no Brasil, foi maior nos estados de Mato Grosso, com 6,1 milhões de hectares, seguido do Rio Grande do Sul, com 5,2 milhões de hectares e Paraná, com 4,8 milhões de hectares, considerando as culturas de soja, milho e algodão (Celeres®, 2010).

Além dos benefícios econômicos trazidos pela adoção dos transgênicos, os benefícios ambientais são bastante expressivos. De 1996 até 2009, 393 milhões de kg de ingrediente ativo utilizados em pesticidas foram economizados. Somente em 2009, a redução das emissões de CO₂ foi da ordem de 18 bilhões de kg, equivalente à retirada de 8 milhões de carros das rodovias (James, 2010).

O mercado de transgênicos no mundo e, principalmente, nos países em desenvolvimento, como o Brasil, está em franca expansão. Nesse cenário, o Brasil vem sendo considerado um dos principais responsáveis pelo aumento da área plantada com OGMs no mundo.

Com o crescimento da área cultivada com transgênicos no país, há a eventual necessidade de monitorar os eventos por um período de cinco anos após sua liberação comercial. Além da necessidade de monitoramento, ressalta-se

que, para a exportação de grãos, há também a necessidade de atender aos padrões dos países importadores. Esses padrões são variáveis entre esses países e, dependendo do país importador, qualquer traço de transgênico pode inviabilizar a exportação. Essa condição exige um controle de qualidade nos campos de produção de sementes e de grãos, durante os processos de produção no campo e no processamento pós-colheita (Nascimento et al., 2012).

O conhecimento de fluxo gênico na cultura do milho faz-se necessário para o estabelecimento de padrões de isolamento dos campos de produção, para garantir que haja a coexistência entre campos convencionais e transgênicos.

2.2 Fluxo gênico

Fluxo gênico pode ser definido como a troca de alelos entre populações, isto é, a transferência de alelos de uma variedade/espécie para outra (Borém, 1999). Sendo o milho uma espécie que tem como agente polinizador o vento e apresentando fecundação cruzada, aumenta a probabilidade de ocorrência de fluxo gênico nessa espécie. Segundo Borém (1999), o pólen do milho pode percorrer distâncias superiores a 100 m, pela ação do vento, evidenciando a importância do uso de mecanismos que impeçam o fluxo gênico entre cultivares.

Estudos em todo o mundo vêm sendo realizados, a fim de se entender o fluxo gênico nas diferentes regiões geográficas do planeta, na tentativa de encontrar os melhores distanciamentos entre campos OGMs e não OGMs (Goggi et al., 2006; Langhof et al., 2008 e 2010; Lavigne et al., 2008; Nascimento et al., 2012; Viljoen e Chetty, 2011).

Vozlie et al. (2010) concluíram que as relações espaciais entre o campo doador e o receptor são o fator mais importante entre os que influenciam diretamente a distribuição da contaminação nos campos.

Della Porta et al. (2007) relataram que a fecundação cruzada em milho é afetada pela distância da fonte de pólen, a direção do vento, o tamanho das áreas de isolamento e a diferença no florescimento entre os receptores e os doadores de pólen.

Em estudo de fluxo gênico em milho realizado na África do Sul, foram determinados valores teóricos de distâncias mínimas entre campos de OGM e não OGM, que visam garantir as taxas de contaminação requeridas pelos órgãos fiscalizadores. Constatou-se que 153 m de distância seriam suficientes para alcançar taxas de fertilização cruzada de 1,0% a 0,1%; 503 m para 0,1% a 0,01% e 1.800 m para 0,01% a 0,001%, tendo a maior distância sido estudada devido ao fato de muitas empresas farmacêuticas não tolerarem traços de OGM em seus produtos (Viljoen e Chetty, 2011).

Goggi et al. (2006) e Langhof et al. (2008) constataram que os maiores valores de fluxo gênico foram observados quando o transgênico se encontrava em topografia superior à do material convencional (direção do vento). Em áreas de material convencional abaixo da área do material transgênico, nas distâncias de 54 a 56 m, foram constatadas contaminações superiores a 0,1% e, em áreas em que o material transgênico se encontrava abaixo do material convencional, nas mesmas distâncias, as contaminações encontradas foram inferiores a 0,1% (Langhof et al., 2008).

Goggi et al. (2006), em estudos realizados na região de Ankeny, estado de Iowa, nos Estados Unidos, constataram que os níveis de contaminação decrescem rapidamente, nos campos, até uma média de 0,5%, aos 35 m de distância, atendendo aos padrões da maioria dos países, que varia de 0,9% a 1,0% de contaminação e, a uma distância de 100 m, os níveis médios de contaminação chegaram a 0,05%. Contudo, metas de produção de milho orgânico com 0,0% de contaminação não são possíveis quando esses campos orgânicos se encontram a uma distância menor que 250 m do campo OGM (sem

utilização de espaçamento temporal). Nascimento et al. (2012) observaram que 82% do fluxo gênico ocorrem nos primeiros 30 m e que, a 100 m de distância do campo receptor em relação ao campo doador, ocorre menos de 1% de contaminação.

Segundo Borém (1999), para que exista alto risco de escape gênico, a espécie deve apresentar elevada taxa de fecundação cruzada e devem existir parentes silvestres compatíveis com ela, compartilhando o mesmo hábitat, geográfica e temporalmente. Mesmo nessas condições, outros aspectos relacionados ao isolamento reprodutivo devem ser considerados.

2.3 Coexistência

A coexistência pode ser afetada pela presença adventícia de uma cultura em outra, que pode ser aumentada por uma série de fatores. Esses fatores incluem impureza de sementes, polinização cruzada, plantas voluntárias, práticas de armazenamento e colheita, transporte e processamento. A presença adventícia resultante da contaminação cruzada é o fator que mais deve ser avaliado nas diferentes áreas de cultivos (Messeguer et al., 2006).

Devido à grande adoção dos transgênicos em todo o mundo, são necessárias precauções para que materiais OGM e não OGM possam coexistir, garantindo os limites de contaminação especificados por cada país. Um dos recentes problemas discutidos é a importância dos cultivos convencionais e orgânicos, buscando-se produções livres de traços de OGM, que se originam da polinização cruzada com os campos de OGM vizinhos (Langhof et al., 2008).

Nas prateleiras dos supermercados brasileiros são disponibilizadas dezenas de produtos em cuja composição constam cereais geneticamente alterados. Da fazenda à fábrica, existem várias etapas, como a armazenagem e o transporte, em que grãos ou óleos de um tipo ou de outro se misturam. Por essa

razão, cerca de 60% de toda a comida processada nos EUA já tem algum tipo de matéria-prima de origem transgênica. Pode haver, ainda, dificuldade de rotulagem de alimentos derivados de plantas transgênicas, devido à equivalência substancial entre os produtos convencionais (Monquero, 2005).

No Brasil, o Decreto-Lei de nº 4.680, de abril de 2003, regulamenta o direito de informação referente aos alimentos que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, ou com presença acima do limite de um por cento do produto. Assim, é obrigatória a rotulagem de produtos com níveis de OGM superiores a 1% (Brasil 2003). Portanto, a coexistência é de suma importância para que se consigam valores de contaminação menores que o estabelecido, visando atender a mercados específicos que rejeitem organismos geneticamente modificados em sua cadeia de alimentação e para a exportação de *commodities*, principalmente em países da África, da Ásia e da Europa (Viljoen et al., 2010)

No Brasil, não existe troca genética entre milho e espécies correlacionadas, levando-se em consideração que os seus ancestrais do milho (*Teosinte complex*, *Zea mays* spp. *mexicanas* e spp. *parviglumis*) estão limitados a regiões do México e da Guatemala (centros de origem).

Para que a coexistência seja possível, uma das principais discussões é sobre o espaçamento e as barreiras necessárias para garantir a pureza dos campos orgânicos e não OGMs. Existem poucas informações a respeito de campos experimentais que remetam sobre a eficácia de diferentes barreiras vegetais como medida de coexistência para a redução da polinização cruzada para as espécies polinizadas pelo vento, como é o caso do milho. Langhof et al. (2008 e 2010) e Le Bail et al. (2010) concluíram, em suas pesquisas, que campos menores que 5 hectares devem ter um padrão mais rígido de isolamento, devido ao maior risco de contaminação. Angevin et al. (2008) constataram, estudando as piores condições (vento a velocidade média de 4 m/s e áreas menores que 4

ha), que, para alcançar os limites de contaminação impostos pela União Europeia de 0,9%, o campo deve ter um isolamento de 100 m e, para contaminação de até 0,1%, essa distância deve ser de 400 m.

Langhof et al. (2008 e 2010), Nascimento et al. (2012) e Viljoenet al. (2011) afirmam que as maiores contaminações se dão nos primeiros 30 m de distância entre o campo não OGM e o OGM. Langhof et al. (2010) sugerem que seja realizada a combinação de isolamento de 100 m com o descarte das três primeiras linhas que se encontram em contato com o material OGM, sendo essa técnica suficiente para garantir que o campo esteja abaixo do limite de 0,9%. Este autor afirma, ainda, que, para a manutenção da coexistência, é interessante o uso das áreas de refúgio, 5% a 10% da área total plantada com material convencional, ao redor do material OGM, que, nos casos de transgênicos resistentes a insetos, exercem dupla função: gerenciamento da resistência de insetos e manutenção dos limites de contaminação.

A Resolução Normativa nº 4, de 16 de agosto de 2007, estabelece distâncias mínimas para permitir a coexistência entre campos OGM e não OGM. A distância entre uma lavoura comercial de milho geneticamente modificado e outra de milho não geneticamente modificado, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 m ou, alternativamente, 20 m, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, dez fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similares aos do milho geneticamente modificado (Brasil, 2007). O agricultor que desobedecer a essas regras fica sujeito às penalidades previstas na Lei nº 11.105/05.

Segundo Paterniani (2006), não há razão para que uma nova tecnologia, como o milho transgênico, não possa conviver com as demais tecnologias, inclusive com a agricultura orgânica, quando são respeitadas as técnicas que evitam as contaminações. Isso já foi comprovado nos países que, por vários anos, mantêm a coexistência de milhos GM e não GM.

Para análise das contaminações entre os campos de produção existem vários métodos de detecção. Porém, os mais utilizados e mais seguros são os métodos baseados na análise do DNA, como é feito na técnica de PCR, com o uso de marcadores moleculares, que identificam o evento, podendo, ainda, possibilitar a quantificação da contaminação ocorrida.

2.4 Marcadores moleculares

A partir do surgimento dos primeiros produtos geneticamente modificados surgiu a necessidade do monitoramento e da verificação da presença desses materiais nas culturas agrícolas e nos produtos delas derivados, o que gerou uma demanda por métodos capazes de detectar, identificar e quantificar tanto o DNA introduzido quanto a proteína expressa nas plantas transgênicas. De acordo com a legislação para a comercialização de organismos geneticamente modificados, é necessário que esses produtos sejam rotulados quando mais de 1% do inserto genético estiver presente (Borém e Caixeta, 2009).

Os marcadores moleculares mais utilizados são aqueles à base de proteínas e os que usam o próprio DNA. Há a necessidade de esses marcadores serem herdados, pois os de proteína são os produtos diretos dos alelos e os marcadores de DNA são os próprios genes ou os seus vizinhos, isto é, as sequências de DNA situadas próximas aos genes que se pretende marcar (Ramalho et al., 2008).

Os métodos analíticos diferem quanto aos procedimentos, sendo a *polymerase chain reaction*, ou PCR, um método bastante difundido e que oferece performance suficiente para detectar OGMs e eventos particulares derivados de OGMs, empregando-se algumas variações nessa tecnologia (Borém e Caixeta, 2009).

As técnicas de análise de OGMs estão em contínuas melhorias, no que diz respeito à acurácia, à confiabilidade e à rapidez. Entretanto, deve ser salientado que a eficiência dessas técnicas pode ser fortemente afetada por estratégias de amostragens e procedimentos inadequados (Borém e Caixeta, 2009).

2.5 *Polymerase Chain Reaction - PCR*

A análise de OGM pode ser realizada tanto pela detecção do DNA exógeno inserido quanto pela proteína específica expressa em plantas transgênicas. Essas proteínas são facilmente detectadas por testes imunoenzimáticos (ELISA), que são simples, específicos e quantitativos (Elenis et al., 2008). Contudo, esse tipo de método é insuficiente para detectar a modificação genética se o gene não for expresso, não produzindo, assim, a proteína (Miraglia et al., 2004).

Como os OGMs são resultados de modificações genéticas, os métodos mais diretos de detecção são aqueles que objetivam a modificação genética em si (Miraglia et al., 2004).

Atualmente, o método baseado em DNA mais comumente utilizado envolve a amplificação do DNA específico com a técnica de PCR, sendo a técnica de PCR em tempo real a tecnologia mais utilizada para a quantificação desse DNA específico. A quantidade de produto sintetizado durante o PCR é quantificado em tempo real pela fluorescência produzida como resultado da amplificação específica. A PCR em tempo real requer termocicladores especiais e a adição de sondas com fluorescências específicas. A quantificação é baseada na fase logarítmica da reação de PCR (Miraglia et al., 2004). A PCR em tempo real quantitativo baseado em fluorescência é comumente considerada uma

técnica simples, estável e vem se tornando um esteio onipresente na biologia molecular (Bustin et al., 2010).

PCR em tempo real se diferencia do PCR convencional pela medição do produto amplificado do PCR a cada ciclo da reação. Ao contrário do PCR convencional, o PCR em tempo real é independente da fase *Plateau* na curva de amplificação, correspondente à saturação da reação, levando a uma quantificação incorreta. Comparada às outras técnicas disponíveis, o PCR em tempo real possibilita a detecção de um ácido nucleico alvo de forma rápida, específica e bastante sensível (Bustin et al., 2010; Elenis et al., 2008; Gachon et al., 2004).

Ingham et al. (2001) demonstraram que a técnica de PCR em tempo real pode ser aplicada na determinação do número de cópias de transgênicos na cultura do milho, consistindo numa técnica rápida e robusta que pode ser automatizada e aplicada a um grande número de amostras, podendo, assim, ser agregada a controles de contaminação entre culturas OGM e não OGMs.

Segundo Jiang et al. (2010), métodos de PCR convencional e em tempo real podem ser utilizados para a detecção de algodão MON15985 e seus derivados, sendo técnicas confiáveis, facilmente executáveis e que podem ser transferidas entre laboratórios de controle de qualidade.

A princípio, a PCR foi desenvolvida para atender a requisitos técnicos específicos, sendo uma técnica muito sensível, cujos resultados proporcionados dificilmente são atingidos por outras técnicas clássicas. Evidentemente, a técnica de PCR, principalmente o PCR em tempo real, tem seu uso limitado devido ao alto custo de suas máquinas e reagentes. No entanto, muito provavelmente, a crescente adoção dessa técnica, visto suas grandes vantagens, fará com que se torne economicamente viável dentro de algum tempo (Gachon et al., 2004).

Para que os resultados gerados pela PCR sejam realmente confiáveis, é de extrema importância que a amostragem feita anteriormente ao teste seja

realizada de forma correta. Para isso, vários tipos de amostragem vêm sendo utilizados em trabalhos de fluxo gênico.

2.6 Amostragem sistemática

A realização de pesquisas é baseada em questões relativas às tomadas de observações da realidade, ou seja, obter uma amostra dessa realidade (Ferreira, 2005). Assim, a amostragem deve ser considerada a primeira e mais importante etapa em processos de medições (Lyn et al., 2007).

Os levantamentos por amostragem permitem obter informações a respeito de valores populacionais desconhecidos, por meio da observação de apenas uma parte (amostra) do universo de estudo (população) (Silva, 2001).

A amostragem sistemática é um método de amostragem simples e de fácil execução e, por isso, muito aplicado na prática (Kao et al., 2011). Seu plano de amostragem é obtido por um critério, pelo qual intervalos regulares de mesmo tamanho entre unidades da amostra são tomados até se compor uma amostra de tamanho n e toda a extensão da localização física da população (Ferreira, 2005).

A amostragem sistemática é uma técnica muito utilizada na agricultura, como, por exemplo, em estudos na área de fitopatologia (Saleh et al., 2010), de entomologia (Losey et al., 2003), no mapeamento de plantas daninhas (Shiratsuchi et al., 2004; Balestreire e Baio, 2001) e em análises de solo (Jiménez et al., 2011; Molin e Silva Júnior, 2003; Molin et al., 2012). Contudo, o uso dessa amostragem em análises de fluxo gênico em milho ainda é escasso.

Segundo trabalho realizado por Vozlie et al. (2010), ao se desenvolverem métodos de amostragem sistemática, a precisão e os custos continuam os mesmos da amostragem aleatória, mas as vantagens estão nas

diretas instruções para a amostragem, a fim de minimizar a subjetividade e aumentar a viabilidade.

A amostragem sistemática, algumas vezes, pode ser chamada de “pseudoamostra aleatória simples”, devido ao fato de possuírem propriedades similares às da amostragem aleatória simples. Porém, a amostragem sistemática é mais simples de ser utilizada em certas situações (Henry, 1990).

Apesar de a amostragem sistemática ser semelhante à aleatória simples, a coleta de amostras deve ser ordenada. Devem ser seguidos alguns passos para a realização da amostragem sistemática, que são:

- a) divide-se o tamanho da população (N) pelo tamanho da amostra (n), obtendo-se um intervalo de retirada (k);
- b) sorteia-se o ponto de partida;
- c) a cada k elementos retira-se uma amostra (Martins, 2006).

Com tudo isso, visando o monitoramento do fluxo gênico, a definição do tipo e do tamanho de amostragem é essencial para um resultado confiável.

REFERÊNCIAS

- ALLNUTT, T. R.; DWYER, M.; MCMILLAN, J.; HENRY, C.; LANGRELL, S. Sampling and Modeling for the Quantification of Adventitious Genetically Modified Presence in Maize. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Vol. 56, No. 9, p. 3232–3237, 2008
- ALZATE-MARIN, A. L. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.
- ANGEVIN, F.; KLEIN, E. K.; CHOIMET, C.; GAUFFRETEAU, A.; LAVIGNE, C.; MESSÉAN, A.; MEYNARD, J. M. Modelling impacts of cropping systems and climate on maize cross-pollination in agricultural landscapes: The MAPOD model. **European Journal of Agronomy**, v.28, p. 471–484, 2008
- AYLOR, D. E.; SCHULTES, NEIL P.; SHIELDS, E. J. An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 119, p. 111–129, 2003.
- BALASTREIRE, L. A.; BAILO, F. H.R. Avaliação de uma metodologia prática para o mapeamento de plantas daninhas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.2, p.349-352, 2001.
- BORÉM, A. **Escape Gênico & Transgênicos**. Viçosa: 2001.
- BORÉM, A. Escape Gênico, Biotecnologia, **Ciência e Desenvolvimento – Encarte especial**, p.101 – 107, 1999
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.
- BRAMMER, S. P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento** – Documentos on line, 03, 2000. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.pdf>. Acesso em: 27 de Março de 2011.
- BRASIL (2003). Decreto 4680/03 | **Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003**. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/legislacao/98701/decreto-4680-03>>. Acesso em 13 de Abril de 2011.

BRASIL (2005). **Lei nº 11.105, de 24 de Março de 2005**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11992.html>>. Acesso em: 25 de Março de 2011.

BRASIL (2007). **PARECER TÉCNICO Nº 987/2007**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/10975.html>>. Acesso em: 25 de Março de 2011.

BULLOCK, D.S., DESQUILBET, M. The Economics of Non-GMO Segregation and Identity Preservation. **Food Policy**, v.27, p. 81-99, 2002.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PTAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p. 597-601, 2005.

BUSTIN, S. A.; BEAULIEU, J.; HUGGETT, J.; JAGGI, R.; KIBENGE, F. S. B.; OLSVIK, P. A.; PENNING, L. C.; TOEGEL, S. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescencebased quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**, 2010.

CÉLERES (2010). **The economic benefits of agricultural biotechnology in Brazil: 1996 – 2009**. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/www.celeres.com.br/1/estudos/PressRelease2009_Economico01_Eng.pdf>. Acesso em: 15 de Março de 2011.

CHAWLA, H.S. **Introduction to Plant Biotechnology**. 2. ed. Science Publisher, Inc. 2007, 538p.

DELLA PORTA, G.; EDERLE, D.; BUCCHINI, L.; PRANDI, M.; VERDERIO, A.; POZZI, C. Maize pollen mediated gene flow in the Po valley (Italy): Source–recipient distance and effect of flowering time. **European Journal of Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 255-265, 2008.

DULLEY, R. D. Biossegurança: muito além da biotecnologia. **Revista de Economia Agrícola**, v.54, n. 2, p. 27-41, 2007

ELENIS, D. S.; KALOGIANNI, D. P.; GLYNOU, K.; IOANNOU, P. C.; CHRISTOPOULOS, T. K. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 347-354, 2008.

ELLSTRAND, N. C. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow, **Philosophical Transaction of the Royal Society**, Lond, v. 358, p. 1163-1170, 2003

FALLER, W. A. **Sampling Statistics**. 1 ed. John Wiley & Sons, Inc. 2009, 449p.

FERREIRA, D. F. **Estatística Básica**, 1.ed. Lavras: UFLA, 2005. 663p.

FREIRE, E. C. Fluxo gênico entre algodoeiros convencionais e transgênicos, **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.6, n.1, p.471-482, 2002.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.

GOGGI, S. A.; CARAGEA, P.; LOPEZ-SANCHEZ, H; WESTGATE, M.; ARRITT, R.; CLARK, C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crops Research**, v.99, p. 147-157, 2006.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Impactos ambientais das plantas transgênicas: as evidências e as incertezas. **Agroecol.e Desenv.Rur.Sustent**, Porto Alegre, v.2, n.3, 2001.

HENRY, G. T. **Practical Sampling**. 21 ed. Sage Publications, Inc. 1990, 143p.

INGHAM, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative Real-Time PCR Assay for Determining Transgene Copy Number in Transformed Plants. **BioTechniques**, v. 31, n. 1, p. 132-140, 2001.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **ISAAA Brief 42-2010: Executive Summary, 2010**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>>. Acesso em: 10 de Abril de 2011.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. **ISAAA Brief 43-2011: Status Global das Variedades Transgênicas/Biotecnológicas Comerciais: 2011**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/highlights/pdf/Brief%2043%20-%20Highlights%20-%20Portuguese.pdf>>. Acesso em: 1 de Maio de 2011.

JIANG, L.; YANG, L.; RAO, J.; GUO, J.; WANG, S.; LIU, J.; LEE, S.; ZHANG, D. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p.402–408, 2010.

JIMÉNEZ, C. E. A.; BECERRA, A. T.; BRAVO, X. L. Effects of the maize-mucuna agroecosystem on soil properties, weed dynamics and maize yield, in traditional farming systems in the Tulijá Valley, Mexico. **Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 12, n.3, p.1615-1631, 2011.

KAO, F. F.; HOLEU, C.; HAKO, C. Remainder Markov systematic sampling. **Journal of Statistical Planning and Inference**, v.141, p. 3595–3604, 2011.

LANGHOF, M.; HOMMEL, B.; HUSKEN, A.; SCHIEMANN, J.; WEHLING, P.; WILHELM, R.; RUHL, G. Coexistence in Maize: Do Nonmaize Buffer Zones Reduce Gene Flow between Maize Fields? **Crop Science**, v. 48, p. 305 – 316, 2008

LANGHOF, M.; HOMMEL, B.; HUSKEN, A.; NJONTIE, C.; SCHIEMANN, J.; WEHLING, P.; WILHELM, R.; RUHL, G. Coexistence in Maize: Isolation Distance in Dependence on Conventional Maize Field Depth and Separate Edge Harvest. **Crop Science**, V. 50, p. 1496–1500, 2010

LAVIGNE, C.; KLEIN, E. K.; MARI, J.; LE B., F.; A., K.; MONOD, H.; ANGEVIN, F. How do genetically modified (GM) crops contribute to background levels of GM pollen in an agricultural landscape? **Journal of Applied Ecology**, 45, p. 1104–1113, 2008.

LE BAIL, M.; LECROART, B.; GAUFFRETEAU, A.; ANGEVIN, F.; MESSEAN, A. Effect of the structural variables of landscapes on the risks of spatial dissemination between GM and non-GM maize. **European Journal of Agronomy**, v. 33, p. 12–23, 2010.

LOSEY, J. E.; ALLEE, L. L.; ZBARSKY, V.; WALDRON, J. K.; SHIELDS, E. J. Transect Sampling to Enhance Efficiency of Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Monitoring in Corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n.5, p. 1420-1425, 2003.

LYN, J. A.; RAMSEY, M. H.; DAMANT, A. P.; WOOD, R. Empirical versus modelling approaches to the estimation of measurement uncertainty caused by primary sampling. **Analyst**, v. 132, p. 1231-1237, 2007.

MARIN, A. L. A.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005

MARTINS, G. A. **Estatística Geral e Aplicada**. 2ed. Editora Atlas, São Paulo, 2006.

MESSEGUER, J.; PEÑAS, G.; BALLESTER, J.; BAS, M.; SERRA, J.; SALVIA, J.; PALAUDELMÀS, M.; MELÉ, E. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, p. 1-13, 2006.

MIRAGLIA, M.; BERDALB, K. G.; C. BRERAA, C.; CORBISIERC, P.; HOLST-JENSEN, A.; KOKD, E. J.; MARVIND, H. J. P.; SCHIMMELC, H.; RENTSCHE, J.; VAN RIED, J. P. P. F.; ZAGONF, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157-1180, 2004.

MOLIN, J. P.; DIAS, C. T. DOS S.; CARBONERA, L. Estudos com penetrometria: Novos equipamentos e amostragem correta. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.16, n.5, p.584-590, 2012.

MOLIN, J.P.; SILVA JÚNIOR, R. L. Variabilidade espacial do índice de cone, correlacionada com textura e produtividade. **Engenharia Rural**, v.14, p. 49-58, 2003.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v.64, n.4, p.517-531, 2005.

NASCIMENTO, V. E.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; SOUZA, J. C.; JÚNIOR, A. D. N. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos. **Pesq. agropec. bras.**, v.47, n.6, p.784-790, 2012.

NELSON, A. P.; J. HEERWAARDEN, V.; PERALES, H. R.; SERRATOSHERNÁNDEZ, J. A. ; RANGEL, A.; HUFFORD, M. B.; GEPTS, P.; GARAY-ARROYO, A.; RIVERASTAMANTE, R. ; ÁLVAREZ-BUYLLA, E. R. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 750-761, 2009.

NODARI, R. O. Biossegurança, transgênicos e risco ambiental: os desafios da nova Lei de Biossegurança. Biossegurança e novas tecnologias na sociedade de risco: aspectos jurídicos, técnicos e sociais. Conceito Editorial, v. 1, p. 17-44, 2007.

NODARI, R.O., GUERRA, M.P. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. **História, Ciências, Saúde**, v.7, n.2, p.481-491, 2000.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Revista de Nutrição**, v. 16(1), p.105-116, 2003.

PATERNINI, E. (2006). **Coexistência de milho GM e não-GM em cultivos comerciais**. Disponível em: http://www.cib.org.br/estudos/estudos_cientificos_ambiental_09.pdf. Acesso em: 02 de Abril de 2011.

RAMALHO, M.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 4.ed. Lavras: UFLA, 2008. 392p.

SALEH, A. A. ; AHMED, H. U.; TODD, T. C.; TRAVERS, S. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F.; GARRETT, K. A. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. **Molecular Ecology**, v. 19, 79–91, 2010.

SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *BT* transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p.847-881, 2002.

SHIRATSUCHI, L.S.; MOLIN, J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Mapeamento da distribuição espacial da infestação de *Panicum maximum* durante a colheita da cultura de milho. **Planta Daninha**, v.22, n.2, p.269-274, 2004.

SILVA, A. L.; WALTER, J. M.; HORBACH, M. A.; QUOIRIN, M. Contenção do fluxo gênico de plantas geneticamente modificadas. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 19, n. 1, p. 18-26, 2007.

SILVA, N. S. Amostragem Probabilística: Um Curso Introdutório. 2ed. EDUSP, São Paulo.

VILJOEN, C.; CHETTY, L. A case study of GM maize gene flow in South Africa. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, p. 1-8, 2011

VOZLIE, J. S.; ROSTOHAR, K.; BLEJEC, A.; KOZJAK, P.; CERGAN, Z.; MEGLIE, V. Development of sampling approaches for the determination of the presence of genetically modified organisms at the field level. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2031-2041, 2010.

CAPÍTULO 2 Análise do fluxo gênico em milho sob diferentes tamanhos de amostras e distâncias de amostragem

RESUMO

Apesar de, no Brasil, não existirem ancestrais selvagens do milho, a preocupação a respeito do fluxo gênico entre lavouras convencionais e transgênicas é real. Assim, objetivou-se, com este trabalho, estimar o fluxo gênico em lavouras comerciais de milho, bem como o estabelecimento de um tamanho de amostra adequado para estimar a taxa de contaminação por transgênicos nos campos convencionais de milho, utilizando a amostragem sistemática. As coletas das amostras foram realizadas em campos de produção de grãos comerciais nos municípios de Itumirim, MG e Madre de Deus, MG, na safra 2010/2011 e na cidade de Ingaí, MG, na safra 2011/2012. Foram coletadas amostras em cinco distâncias do campo convencional em relação ao campo de transgênicos: 5, 10, 20, 50 e 100 m, com exceção do campo amostrado no município de Ingaí, onde não foram coletadas as amostras na distância de 5 m. Foram também coletados quatro diferentes tamanhos de amostra: 1, 5, 10 e 15 espigas, em quatro repetições. Após as coletas, as espigas foram secas, debulhadas manualmente e retirou-se de cada amostra uma alíquota de 300 sementes, que foram trituradas e prosseguiu-se com a realização do PCR em tempo real, para a estimação do fluxo gênico. Não houve diferença estatística entre os diferentes tamanhos de amostras analisados nos três locais amostrados. Em Itumirim e em Madre de Deus também não houve diferença estatística entre as distâncias analisadas; já no campo do município de Ingaí, as amostras coletadas na distância de 10 m apresentaram maior taxa de contaminação com transgênicos quando comparadas às das outras distâncias amostradas. Em todos os campos amostrados a contaminação média ficou abaixo de 1%, limite estipulado pelo governo, pelo Decreto de Lei 4.680, de 2003, para rotulagem.

Palavras Chave: Coexistência. Milho. Contaminação

ABSTRACT

Although in Brazil there are no maize wild ancestors, the concern about gene flow among conventional and transgenic crops is real. Thus, the objective of this work was to estimate the gene flow in commercial maize farms, as well as the establishment of an adequate sample size to estimate the contamination rate by transgenic in conventional maize fields, using systematic sampling. The samples collections were carried out in fields of grain commercial production in the Itumirim and Madre de Deus municipalities, both in Minas Gerais state, in 2010/2011 crop and in Ingaí, also Minas Gerais state, in 2011/2012 crop. Samples were collected at five distances in the conventional field compared to transgenic field: 5, 10, 20, 50 and 100 m, with the exception of the field sampled in the Ingaí municipalitie, where the samples were not collected at the distance of 5 m. Four different sample sizes were also collected: 1, 5, 10 and 15 spikes, in four replications. After collection, the spikes were dried, threshed by hand and withdrew a portion of 300 seeds of each sample, which were mashed and proceeded with the implementation of real-time PCR for the gene flow estimation. There was no statistical difference among the different samples sizes analyzed at the three sites. In Itumirim and Madre de Deus also no statistical difference observed among the distances analyzed; the samples collected in Ingaí field in a distance of 10 m had a higher contamination rate with transgenics when compared to other sampled distances. In all fields sampled, the average contamination was below 1% limit stipulated by the government, Decree Law 4.680, of 2003, for labeling.

Key words: Coexistence. Maize. Contamination.

1 INTRODUÇÃO

O fluxo gênico entre plantas convencionais e transgênicas vem sendo um dos assuntos mais abordados pela sociedade científica, como ameaça à pureza genética em grãos e sementes.

Apesar de, no Brasil, não existirem ancestrais selvagens do milho, há a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico vertical entre cultivares da mesma espécie. Para garantir a coexistência, o governo publicou a Resolução Normativa nº 4, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), de 16 de agosto de 2007, que estabelece as distâncias mínimas de isolamento a serem mantidas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e cultivos de milho convencionais, para permitir a coexistência entre os diferentes sistemas de produção no campo (Brasil, 2007). Essa resolução estabelece que a distância entre uma lavoura de milho geneticamente modificada e outra de milho convencional deve ser igual ou superior a 100 m, com a alternativa de 20 m, desde que acrescida de uma bordadura com, pelo menos, 10 linhas de milho convencional com porte e ciclo similares aos do milho geneticamente modificado (Monsanto, 2008).

Para garantir também o poder de escolha dos consumidores, no Brasil, o Decreto-Lei nº 4.680, de abril de 2003, regulamenta o limite de 1% de transgênicos em alimentos para que se faça a rotulagem do mesmo (Brasil, 2003).

A utilização de marcadores moleculares em contrapartida aos marcadores morfológicos, que eram utilizados no começo dos estudos, propiciou uma estimativa mais adequada da troca de pólen entre as diferentes cultivares. Contudo, alguns percalços ainda têm dificultado essa estimativa e um deles é a escolha da técnica de amostragem mais adequada a ser utilizada. A utilização do

método de amostragem correto e do tamanho de amostra necessário nem sempre é realizado, prejudicando o resultado do estudo.

A amostragem sequencial vem ganhando a atenção dos pesquisadores pelo seu potencial de redução de custos, devido à possibilidade de diminuição do tamanho de amostra a ser utilizada (Nascimento et al., 2012). Porém, um método sistematizado faz-se necessário no Brasil, pois a utilização de uma única metodologia seria interessante no sentido de obter a homogeneidade de resultados, principalmente quando se trata de amostragem em campos de produção.

Assim, objetivou-se, com este trabalho, a determinação do fluxo gênico em milho utilizando a amostragem sistemática, bem como o estabelecimento de um tamanho de amostra adequado para estimar a taxa de contaminação por transgênicos em campos convencionais de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem sistemática

As coletas das amostras de milho foram realizadas em campos de produção de grãos nos municípios de Itumirim, MG e Madre de Deus, MG, na safra 2010/2011 e na cidade de Ingaí, MG, na safra 2011/2012. Foi observado o ciclo dos híbridos transgênicos e convencionais, a fim de assegurar o sincronismo de florescimento entre eles para garantir a possibilidade de ocorrência do fluxo gênico.

Foi analisado o fluxo gênico entre híbridos convencionais e transgênicos com evento Herculex (TC1507), da empresa Dow Agrosience, que tem tolerância ao herbicida glufosinato de amônio e resistência a insetos da ordem Lepdoptera, nas cidades de Madre de Deus e Itumirim. Já na cidade de Ingaí, foram coletadas amostras para estimativa de fluxo gênico entre o híbrido convencional e transgênico, este último possuindo o evento VT-Pro (MON89034), da empresa Monsanto do Brasil, que tem resistência a insetos da ordem Lepdoptera. Na Tabela 1 são apresentados os híbridos que foram utilizados em cada local e seus respectivos ciclos.

Tabela 1 Híbridos utilizados no estudo do fluxo gênico em milho

Local	Híbrido	GDU*
Itumirim	2B707	890
	2B707Hx	890
Madre de Deus	2B587Hx	815
	RB9108	845
Ingaí	DKB390Pro	845
	DKB175	852

*Unidade de graus dias

Foram coletadas amostras em cinco distâncias do campo convencional em relação ao campo de transgênicos, 5, 10, 20, 50 e 100 m, com exceção do campo amostrado na cidade de Ingaí, onde foram coletadas amostras em quatro distâncias, pois houve impossibilidade de realizar coleta na distância de 5 m, devido à separação dos campos, que foi feita por meio de uma estrada de 10 m de largura. A distância máxima de amostragem escolhida foi baseada na Resolução Normativa nº 4, da CTNBio, de 2007, que estabelece 100 m como padrão de isolamento para a garantia de coexistência. Foram também coletados quatro diferentes tamanhos de amostra, 1, 5, 10 e 15 espigas. Foram realizadas quatro repetições no campo, resultando, então, em 80 amostras por campo de produção em Itumirim e em Madre de Deus e 64 amostras no campo de produção em Ingaí.

As amostras foram coletadas traçando-se linhas de 100 m de extensão em cada uma das distâncias de amostragem analisadas (5, 10, 20, 50 e 100 m). Como foram realizadas quatro repetições, a cada 25 m desta linha coletaram-se as amostras de 1, 5, 10 e 15 espigas, aleatoriamente, em cada um dos quatro pontos de amostragem de cada distância. Esse procedimento foi repetido nas cinco distâncias amostradas nos campos nos municípios de Itumirim e Madre de Deus (Figura 1) e nas quatro distâncias de amostragem utilizadas no campo de Ingaí.

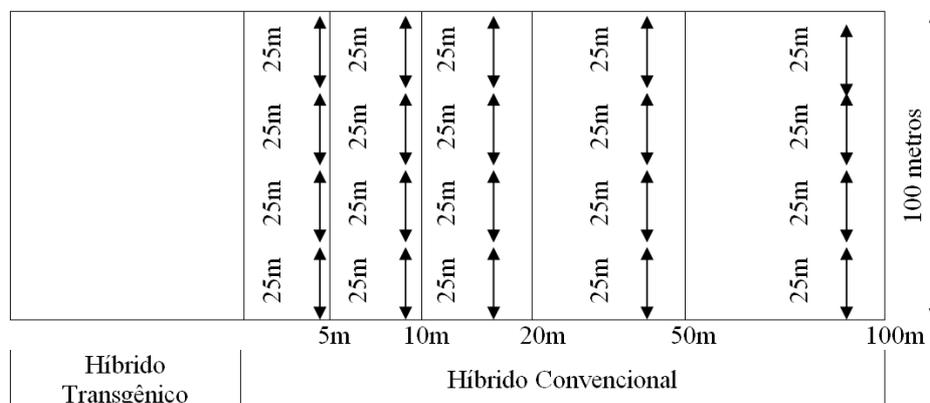


Figura 1 Croqui da amostragem realizada no campo de Itumirim e de Madre de Deus, MG

A cidade de Itumirim situa-se no sul de Minas Gerais, a $21^{\circ} 19' 01''$ de latitude Sul e $44^{\circ} 52' 16''$ de longitude Oeste, sendo uma região montanhosa, à altitude de 870,56 m. O clima é de transição entre Cwa e Cwb, de acordo com a classificação climática de Köppen (Antunes, 1986 citado por Loschi et al., 2011), em que Cwa é caracterizado como mesotérmico, com inverno seco e verão chuvoso, no qual a temperatura média do mês mais frio é inferior a 18°C e a do mês mais quente é superior a 22°C , enquanto, no Cwb, a temperatura média do mês mais quente é inferior a 22°C (Loschi et al., 2011). A precipitação média anual é de 1.530 mm e a umidade relativa média anual é de 76% (BRASIL, 1992 citado por Pereira et al., 2010).

Madre de Deus localiza-se na região centro-sul de Minas Gerais, a $21^{\circ} 28' 58''$ de latitude Sul e $44^{\circ} 19' 48''$ de longitude Oeste, à altitude de 990 m. O clima, de acordo com a classificação climática de Köppen, é do tipo Cwb-mesotérmico, com temperatura média anual de $19,2^{\circ}\text{C}$, com máximas mensais de $26,1^{\circ}\text{C}$ e mínimas mensais de $13,7^{\circ}\text{C}$ (Gavilanes et al., 1992). A precipitação

média anual é de 1.517 mm, sendo que 93% das chuvas ocorrem entre outubro e abril (Oliveira-Filho et al. 1994 citado por Guilherme e Ressel, 2001).

Ingaí localiza-se a 21° 14' 59'' de latitude Sul e a 44° 59' 27'' de longitude Oeste, entre 1.000 e 1.250 m de altitude (Júnior et al., 2010). O clima da região, segundo o Sistema de Classificação Climática de Köppen, enquadra-se no tipo Cwb (mesotérmico com verões brandos e chuvosos e estiagem de inverno), com precipitação média anual de 1.411 mm e com períodos de chuvas irregulares, predominantes no verão. A temperatura média anual é de 19,3 °C, e as médias registradas nos meses mais quentes (verão) estão entre 21,2 °C e 21,9 °C e, nos meses mais frios (inverno), de 15,6 °C e 14,4 °C (Júnior e Júnior, 2009 citados por Campos et al., 2011).

Após as coletas, as espigas foram transportadas para o Laboratório Central de Sementes da UFLA, onde foram submetidas à secagem, a 35 °C, até os grãos atingirem o teor de água de 14%. A debulha foi realizada manualmente e os grãos foram acondicionados em sacos de papel e armazenados em câmara fria regulada a 10±2 °C e 75% UR±5, até as análises.

2.2 PCR em tempo real

Para a quantificação das taxas de contaminação com transgênicos, foi realizado o teste de PCR em tempo real, no Laboratório Central do Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras, devidamente habilitado (conforme os requisitos da NBR ISO/IEC 17025:2005 e as normas estabelecidas pela CTNBio para a manipulação de OGMs) e credenciado no MAPA para a execução de tais análises.

Após a debulha e a homogeneização dos grãos, amostrou-se uma alíquota de 300 grãos, conforme estudo prévio realizado por Nascimento et al. (2012), que estabeleceram a quantidade de 300 sementes como tamanho de

amostra necessária para a identificação de, no mínimo, 1% de contaminação. As sementes foram trituradas em liquidificador até a obtenção de um pó fino e, em seguida, procedeu-se à extração do DNA das amostras a serem analisadas e daquelas que foram utilizadas como material de referência utilizando o reagente PrepMan® (Applied Biosystem), conforme recomendações do fabricante.

Como material de referência para a determinação do percentual de OGMs nas amostras, foram utilizados os padrões de referência certificados (CRM), produzidos pelo Institute for Reference Materials and Measurement (IRMM). Foram utilizadas amostras com 0,0%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% (p/p) de milho MON89034 e 0,0%, 0,1%, 1,0% e 10,0% (p/p) de milho TC1507.

Após a extração do DNA, realizou-se a reação em triplicata das amostras utilizando-se o kit *TaqMan GMO Maize 35S Detection Kit* para os alvos CaMV 35S (promotor) e zeína (referência endógena), para volume final de 25 μ L.

A reação foi então amplificada no equipamento ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems), com a utilização do ciclo de amplificação de 9 minutos, a 95 °C e 40 ciclos de 20 segundos, a 95 °C; 1 minuto, a 60 °C e 30 segundos a 72 °C. A leitura da curva de amplificação foi feita em tempo real, pelo mesmo aparelho.

Os dados foram analisados por meio do software v.2.0.1, do sistema 7500 de PCR em tempo real (Applied Biosystems), utilizado na quantificação absoluta pelo método do Δ Ct (*Threshold cycle*). Em seguida, os resultados foram exportados para um arquivo Excel, onde foram realizadas as análises dos resultados. O cálculo da porcentagem de OGM nas amostras foi realizado seguindo o método de Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene 35S e do controle endógeno (zeína) que, quando subtraídos, têm como resultado o Δ Ct (Ct 35S – Ct zeína). Após o cálculo do Δ Ct de cada amostra, foi feita a média entre os Δ Cts das triplicatas e calculado o desvio padrão entre elas. Foi realizada, então, a análise de regressão linear na escala logarítmica dos Δ Cts dos

padrões de referência. A porcentagem de OGM de cada amostra foi, então, inferida a partir da curva dos padrões de referência.

Foi realizada análise de variância nos dados obtidos, utilizando-se o programa estatístico SAS®. O delineamento experimental considerado foi de blocos casualizados com esquema fatorial 5x4 (5 distâncias – 5, 10, 20, 50 e 100 m e 4 tamanhos de amostra – 1, 5, 10 e 15 espigas), com 4 repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Itumirim safra 2010/2011

Não houve diferença nas contaminações nas diferentes distâncias, nos diferentes tamanhos de amostra e na interação entre eles nas amostras coletadas no município de Itumirim, na safra 2010/2011.

Tabela 2 Estimativa de porcentagem média de contaminações detectada nas diferentes distâncias no município de Itumirim, MG, safra 2010/2011

Distâncias (m)	Médias % de contaminações
5	0,00 a
10	0,00 a
20	0,00 a
50	0,10 a
100	0,00 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste f, a 5% de significância.

Tabela 3 Estimativa de porcentagem média de contaminações detectada nos diferentes tamanhos de amostras, no município de Itumirim, MG, safra 2010/2011

Tamanho de amostra (espigas)	Médias % de contaminações
1	0,02 a
5	0,00 a
10	0,01 a
15	0,05 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste f, a 5% de significância.

Um dos fatores que podem ter influenciado a baixa taxa de fecundação cruzada nesse terreno é a direção dos ventos. Hoylee Cresswell (2007), estudando o efeito do vento na polinização cruzada de várias espécies, inclusive no milho, verificou que sua direção e velocidade, no momento do florescimento, têm forte influência nas taxas de contaminações, variando entre locais e nos mesmos locais, variando entre os anos.

A contaminação em pontos mais distantes no campo convencional, como na distância de 50 m, foi devido ao acaso, pois não foi observada diferença estatística significativa entre as diferentes distâncias analisadas. Essa contaminação pode ter sido influenciada pela presença de fatores incomuns de contaminação no campo, como rajadas de ventos no período de florescimento (Bannert e Stam, 2007; Vogler et al., 2009).

Outra fonte de contaminação que deve ser ressaltada em campos de produção de grãos é a presença de plantas atípicas na área, o que pode ter causado a baixa contaminação (Palaudelmàs et al., 2009). A presença de sementes remanescentes de safras anteriores, por exemplo, pode originar plantas transgênicas que causam baixas taxas de contaminação devido ao seu menor poder de competição frente ao outro híbrido presente no campo. Além disso, as sementes de milho compradas como convencionais podem ter contaminações com transgênicos, visto que testes que comprovem a pureza genética das mesmas não são obrigatórios para a comercialização de sementes no Brasil.

A disposição e o tamanho dos campos no município de Itumirim podem ser mais bem visualizados na Figura 2.

2B707 (Convencional) 4 ha	2B707Hx (Transgênico) 3 ha
---------------------------------	----------------------------------

Figura 2 Croqui da localização do campo convencional no município de Itumirim, MG, 2011.

A contaminação média observada em Itumirim foi de 0,02%. Esse baixo valor de contaminação pode ser explicado pela junção de uma série de fatores que dificultaram a polinização cruzada nesse local, como topografia do terreno e direção dos ventos.

Na Figura 3 pode ser observado o comportamento de contaminação das plantas convencionais com pólen transgênico.

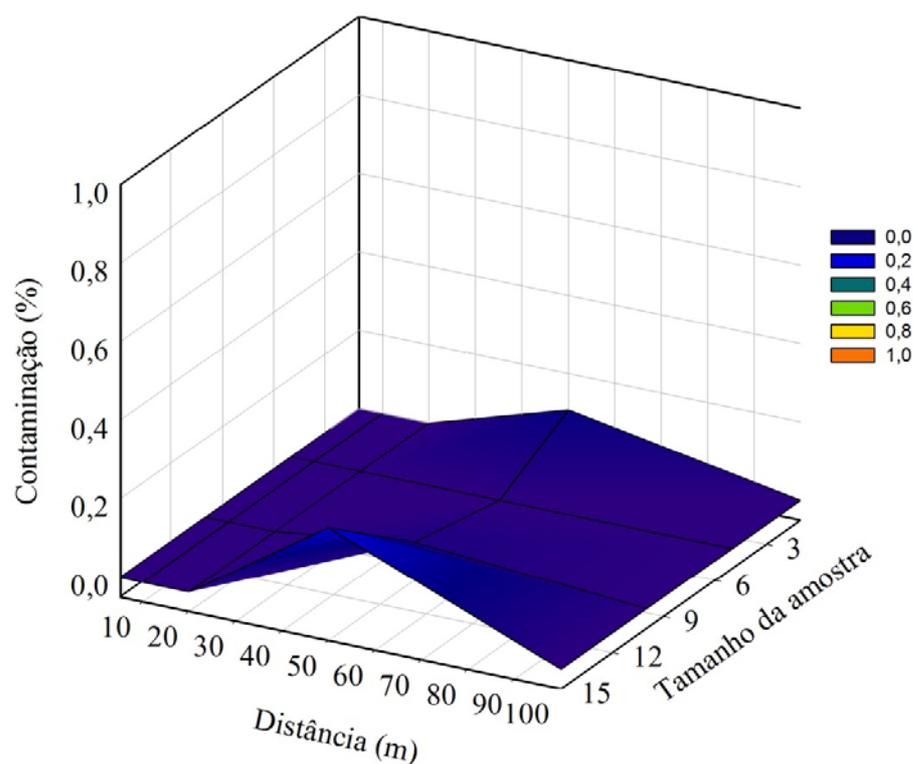


Figura 3 Médias do fluxo gênico detectadas nas diferentes distâncias e tamanhos de amostras, na cidade de Itumirim, safra 2010/2011.

3.2 Madre de Deus, safra 2010/2011

Na cidade de Madre de Deus houve maior variação nas taxas de contaminações nas diferentes distâncias analisadas, o que pode ser devido à localização do campo de milho convencional, que se encontrava entre dois campos transgênicos, sendo uma área de refúgio do produtor, com influência de pólen transgênico em suas duas extremidades (Figura 4). Na técnica de PCR em tempo real utilizada identifica-se somente o gene promotor utilizado na inserção

(CaMV35S), não sendo possível o conhecimento da origem da contaminação. Contudo, não houve diferença estatística significativa entre as distâncias e o tamanho de amostra nesse campo.

Herculex (2B587) 15 ha	Convencional (RB9108) 20 ha	VTPro (AG8061PRO)
------------------------------	-----------------------------------	----------------------

Figura 4 Croqui da localização do campo convencional no município de Madre de Deus, MG, 2011.

No campo de Madre de Deus, a área plantada com transgênico era bem maior que a área plantada com material convencional, o que pode também ter influenciado os resultados observados. Palaudelmàs et al. (2012), estudando a influência do tamanho dos campos doadores e receptores de pólen, verificaram que a duplicação no tamanho da campo doador resultou em acréscimo de 7% no conteúdo de OGM no campo receptor. A pressão de pólen exerce forte influência nas polinizações cruzadas (Goggi et al., 2007) e, sendo assim, é importante frisar que praticamente toda a área no entorno do campo convencional foi cultivada com híbridos transgênicos de milho, na safra 2010/2011.

Kawashima et al. (2011), analisando a fecundação cruzada em três safras, observaram que as taxas de fecundação não ocorriam de forma homogênea e que a distribuição das contaminações produziu ilhas isoladas com altas taxas de contaminações e, mesmo em locais distantes do campo doador, a fecundação cruzada não ocorre espacialmente de forma homogênea.

Mesmo com a grande variabilidade de contaminações observadas ao longo das distâncias, não houve diferenças significativas entre as médias observadas nas distâncias, nos tamanhos de amostra e também na interação entre eles, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias no município de Madre de Deus, MG, safra 2010/2011

Distâncias (m)	Médias % de contaminações
5	0,22 a
10	0,14 a
20	0,09 a
50	0,39 a
100	0,19 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste f, a 5% de significância.

Tabela 5 Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada nos diferentes tamanhos de amostras no município de Madre de Deus, MG, safra 2010/2011

Tamanho de amostra (espigas)	Médias % de contaminações
1	0,20 a
5	0,15 a
10	0,33 a
15	0,15 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

O comportamento das contaminações ao longo do campo convencional, considerando os diferentes tamanhos de amostras, pode ser observado no gráfico da Figura 5.

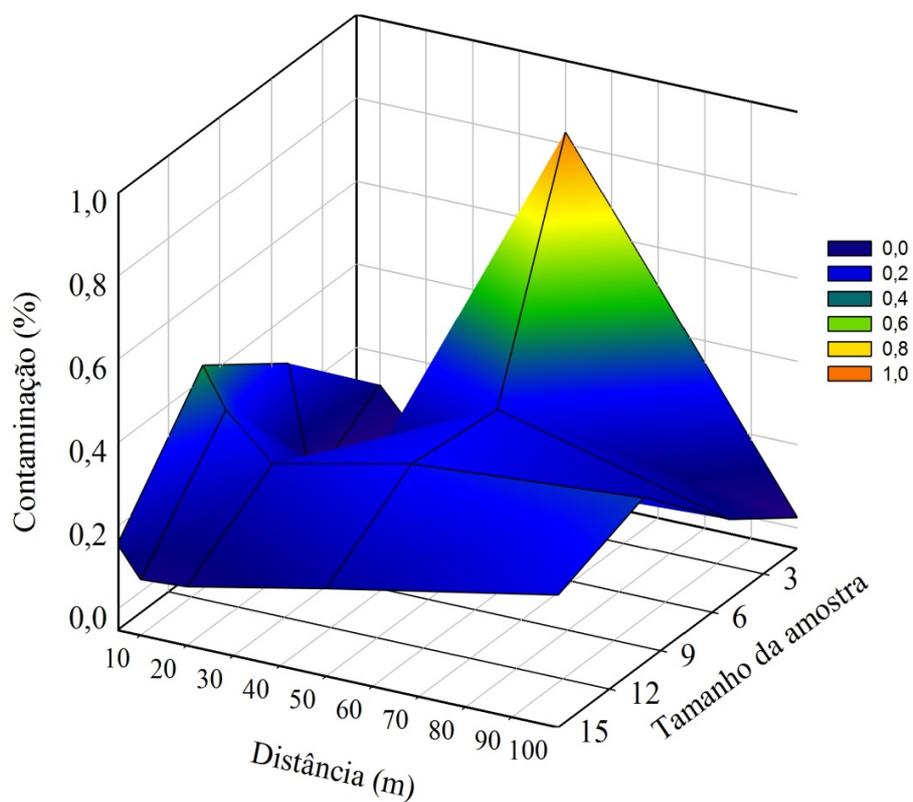


Figura 5 Médias do fluxo gênico detectadas nas diferentes distâncias e tamanhos de amostras, na cidade de Madre de Deus, MG, safra 2010/2011.

A média geral de contaminação no campo amostrado em Madre de Deus foi de 0,21%, bem abaixo de 1%, que determina a rotulagem de materiais convencionais como contendo traços de transgênicos.

3.3 Ingaí, safra 2011/2012

As observações geradas no campo de Ingaí foram as mais consistentes, quando comparadas aos dados observados em estudos de fluxo gênico em todo o

mundo, ou seja, foram constatadas maiores contaminações em menores distâncias.

No caso desse local, especificamente, não foi possível realizar a coleta de amostras na distância de 5 m, pois os dois campos, convencional e transgênico, estavam divididos por uma estrada de 10 m de largura. Desse modo, a menor distância possível para a realização de amostragem foi de 10 m do campo convencional em relação ao campo transgênico, como pode ser mais bem visualizado na Figura 6.

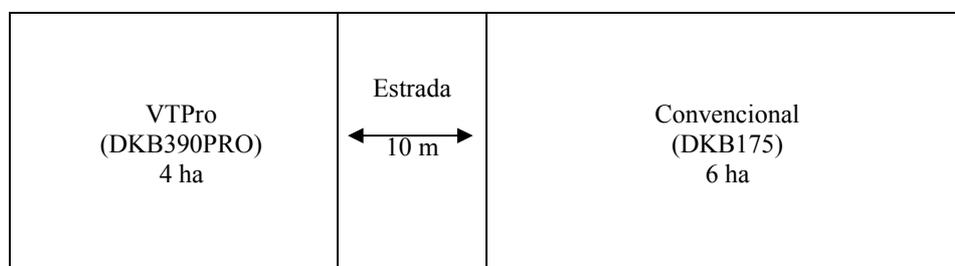


Figura 6 Croqui da localização do campo convencional no município de Ingaí, Minas Gerais, 2011

Foi observada diferença significativa das contaminações em relação às distâncias de amostragem, porém, não houve diferença estatística entre os diferentes tamanhos de amostras analisadas (Tabelas 6 e 7). Também não foi observada interação entre os dois fatores analisados.

Tabela 6 Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada nas diferentes distâncias no município de Ingaí, MG, safra 2011/2012

Distâncias (m)	Médias % de contaminações
10	0,77 a
20	0,00 b
50	0,02 b
100	0,00 b

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 7 Estimativa de porcentagem média de fecundação cruzada detectada nos diferentes tamanhos de amostras no município de Ingaí, MG, safra 2011/2012

Tamanho de amostra (espigas)	Médias % de contaminações
1	0,19 a
5	0,21 a
10	0,16 a
15	0,23 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste f, a 5% de significância.

As contaminações em campos de milho convencionais nas proximidades do campo transgênico já eram esperadas, tendo em vista a dispersão do pólen, que se dá por poucos metros, em condições normais de vento, temperatura e umidade. Sendo assim, a frequência de pólen advindo do fluxo gênico dos genes transgênicos para convencional diminui significativamente com o aumento da distância (Zhang et al., 2011). Viaud et al. (2008) observaram que a maioria do pólen do doador se deposita nos primeiros 10 m, no campo do receptor. Nascimento et al. (2012), estudando também o fluxo gênico em milho, observaram que 82% das contaminações ocorreram nos primeiros 30 m de distância.

Na maioria dos campos analisados em várias pesquisas, pode-se constatar que existe correlação negativa entre a distância e a fecundação cruzada (Riesgo et al., 2010), decrescendo exponencialmente com o aumento da distância entre o receptor e o doador de polén (Goggi et al., 2006; Kawashima et al., 2011).

Kawashina et al. (2011), estudando o efeito do ambiente na taxa de fecundação cruzada em milho, observaram que essa taxa tende a decrescer exponencialmente em função da distância do campo receptor em relação ao campo doador. Porém, ela não atinge 0% de contaminação, mesmo em pontos distantes de 800 m do campo transgênico.

Em experimento no qual foi utilizado método sistemático aleatorizado, Sustar-Vozlic et al. (2010) observaram que as maiores contaminações foram observadas na distância de 10 m do campo receptor em relação ao campo doador, quando comparada à outra distância analisada, que foi de 25 m.

Outro fator a ser considerado é a separação das duas áreas de milho, que era feita por uma estrada rural de, aproximadamente, 10 m. Sabe-se que o isolamento com áreas sem vegetação, ou seja, sem nenhuma barreira, tende a facilitar a troca de pólen entre os campos (Riesgo et al., 2010).

A contaminação média em Ingaí foi de 0,20%, bem próximo à contaminação média de Madre de Deus e bem abaixo do limite de 1% estabelecido pelo Decreto 4.680, de 2003, para rotulagem de alimentos. O padrão de contaminação observado no campo está representado na Figura 7.

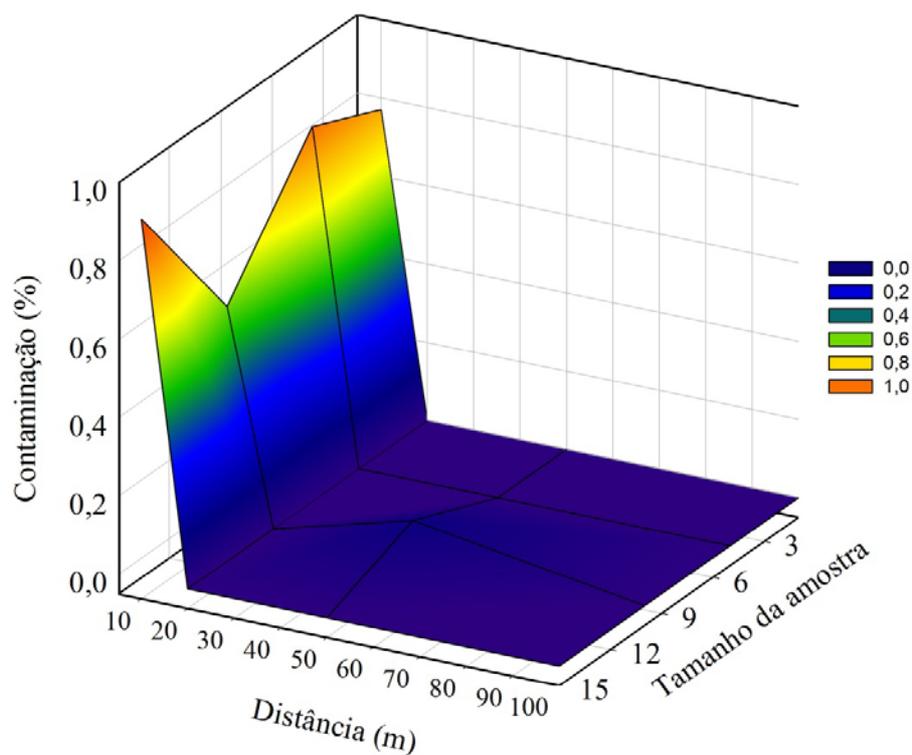


Figura 7 Médias do fluxo gênico detectadas nas diferentes distâncias e tamanhos de amostras, na cidade de Ingai, MG, safra 2011/2012.

3.4 Análise conjunta

Foi realizada a análise de variância conjunta entre os três campos estudados. Houve interação significativa entre locais e distâncias e todas as outras interações entre os fatores envolvidos não foram significativas.

Pelo teste de médias, fixando-se o fator distância, foi observada diferença estatística somente na distância de 10 m, em que, no campo localizado em Ingai, houve maior taxa de contaminação, como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 Estimativa de porcentagem média de contaminações detectada nas diferentes distâncias: locais

Local	Distâncias (m)				
	5	10	20	50	100
Itumirim	0,00 aA	0,00 bA	0,00 aA	0,10 aA	0,00 aA
Madre Deus	0,22 aA	0,14 bA	0,09 aA	0,39 aA	0,19 aA
Ingai		0,77 aA	0,00 aB	0,02 aB	0,00 aB

As médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

No teste de médias realizado, fixando-se o fator local, houve diferença significativa somente em Ingaí, tendo a contaminação observada na distância de 10 metros sido maior, como se observa nos dados da Tabela 8.

A diferença encontrada entre os campos nas diferentes localidades era esperada, visto que o nível de contaminação é muito variável, devido às peculiaridades da região, à velocidade e à direção dos ventos, ao sincronismo de florescimento entre os híbridos analisados e também à pressão de pólen entre os híbridos, ao tamanho dos campos convencionais em relação aos transgênicos e às distâncias entre os campos (Della Porta et al., 2008; Galeano et al., 2010; Goggi et al., 2007; Hoyle et al., 2007; Palauelmàs et al., 2012; Viaud et al., 2008;). Com isso, a adoção de padrões rígidos de isolamento torna-se deficiente, haja vista o grande número de variáveis que podem alterar o fluxo gênico.

Vários autores sugerem que sejam adotados padrões específicos para cada região, levando também em consideração outras formas de isolamento, como o temporal, que pode ser uma importante ferramenta na diminuição dos níveis de contaminação (Devos et al., 2008; Hoyle et al., 2007; Le Bail et al., 2010; Viljoen e Chetty, 2011). O isolamento temporal faz com que ocorra uma falta de sincronismo no florescimento, sincronismo esse que também pode ser evitado com a utilização de híbridos com diferentes ciclos (Bannert et al., 2008; Della Porta et al., 2008).

Barreiras de pólen também podem evitar de maneira significativa o fluxo gênico, apresentando melhores resultados quando comparadas a isolamentos com área sem cobertura vegetal. Melhores resultados podem ser ainda obtidos utilizando-se híbridos de milho convencionais com alta pressão de pólen na barreira de isolamento (Goggi et al., 2006).

A não observância de diferença estatística entre os diferentes tamanhos de amostras pode ser explicada pelos baixos valores de contaminações encontrados em todos os campos analisados.

O mais importante acerca da discussão sobre métodos eficientes de isolamento é a manutenção da possibilidade de coexistência entre materiais convencionais e transgênicos, atendendo às exigências de diferentes mercados.

4 CONCLUSÕES

As porcentagens médias de contaminações de eventos transgênicos em lavouras de milho convencional foram muito baixas, sempre inferiores a 1%, independente da distância de amostragem, do local considerado e do tamanho de amostra.

Em função da baixa magnitude de fluxo gênico detectado neste trabalho, não é possível afirmar qual o tamanho de amostra adequado para a determinação do fluxo gênico.

REFERÊNCIAS

BANNERT, M.; STAMP, P. Cross-pollination of maize at long distance. **Europ. J. Agronomy**, v. 27, p. 44–51, 2007.

BANNERT, M.; VOGLER, A.; STAMP, P. Short-distance cross-pollination of maize in a small-field landscape as monitored by grain color markers. **Europ. J. Agronomy**, v.29, p. 29–32, 2008.

BRASIL (2007). Resolução Normativa nº 4 de 16/08/2007 / CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Disponível em:** <<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinke.php?numlink=1-240-36-2007-08-16-4>>. **Acesso em: 12 de Abril de 2012.**

CAMPOS, H.R, CARDOSO SILVA, S.A; SOARES JUNIOR, F. J. Estrutura populacional de *Vochysia thyrsoidea Pohl.* em uma área de transição entre Cerrado Stricto Sensu e Campo Rupestre, no Município de Ingaí, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**, v .17, n. 2, p. 5-14, 2011.

DELLA PORTA, G.; EDERLE, D.; BUCCHINI, L.; PRANDI, M.; VERDERIO, A.; POZZI, C. Maize pollen mediated gene flow in the Po valley (Italy): Source–recipient distance and effect of flowering time. **European Journal of Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 255-265, 2008.

DEVOS, Y.; THAS, O.; COUGNON, M.; DE CLERCQ, E. M.; CORDEMANS, K.; REHEUL, D. Feasibility of isolation perimeters for genetically modified maize. **Agron. Sustain. Dev.**, v. 28, n. 2, 2008

GALEANO, P.; DEBAT, C. M.; RUIBAL, F.; FRAGUAS, L. F.; GALVÁN, G. A. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. **Environ. Biosafety Res.**, v. 9, p. 147–154, 2010.

GAVILANES, M. L.; FILHO, A. T. O.; CARVALHO, D. O.; VILELA, E. A. Flora arbustiva-arbórea de uma mata ciliar do Alto Rio Grande, em Madre de Deus de Minas - MG. **Daphne**, v. 2, n. 4, p. 15-24, 1992.

GOGGI, A. S.; CARAGEA, P.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; WESTGATE, M; ARRITT, R; CLARK, C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crops Research**, v.99, p.147-157, 2006.

GOGGI, S. A.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; CARAGEA, P.; WESTGATE, M.; ARITT, R.; CLARK, C. A. Gene flow in maize fields with different local pollen densities. **International Journal of Biometeorology**, v. 51, p. 493-503, 2007.

GUILHERME, F. A. G.; RESSEL, K. Biologia floral e sistema de reprodução de *Merostachys riedeliana* (Poaceae: Bambusoideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p.205-211, 2001.

HOYLE, M.; CRESSWELL, J. E.. The effect of wind direction on cross-pollination in wind-pollinated gm crops. **Ecological Applications** v.17, p. 1234–1243, 2007.

JÚNIOR, W. R. A.; ALEXANDRE, L. P. B.; JÚNIOR, F. J. S. Análise da distribuição diamétrica de *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae) em um trecho de cerrado stricto sensu no Município de Ingai, Minas Gerais. **Gaia Scientia**, v. 4, n. 1, p. 35-42, 2010.

KAWASHIMA, S.; NOZAK, H.; HAMAZAKI, T.; SAKATA, S.; HAMA, T.; MATSUO, K.; NAGASAWA, A. Environmental effects on long-range outcrossing rates in maize. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 142, p. 410–418, 2011.

LE BAIL, M.; LECROART, B.; GAUFFRETEAU, A.; ANGEVIN, F.; MESSEAN, A. Effect of the structural variables of landscapes on the risks of spatial dissemination between GM and non-GM maize. **Europ. J. Agronomy**, v.33, p. 12–23, 2010.

LOSCHI, R. A.; PEREIRA, J. A. A.; MACHADO, E. L. M.; CARLOS, L.; SÁ, J. J. G.; MARQUES, M. Interações espécie-ambiente na colonização de uma voçoroca em Itumirim, Minas Gerais. **Cerne**, v. 17, n. 2, p. 161-180, 2011.

MONSANTO (2008). **Milho Transgênico. Distâncias Mínimas para Isolamento: Normas para Plantio**. Disponível em: <http://www.monsanto.com.br/produtos/stewardship/pdf/cartilha_distancias_milho.pdf>. Acesso em: 12 de Abril de 2012.

NASCIMENTO, V. E.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; SOUZA, J. C.; JÚNIOR, A. D. N. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos. **Pesq. agropec. bras.**, v.47, n.6, p.784-790, 2012.

PALAUDELMÀS, M.; MELÉ, E. E. Assessment of the influence of field size on maize gene flow using SSR analysis. **J J Messeguer. Transgenic Res**, v.21, p. 471-83, 2012.

PALAUDELMÀS, M.; PENÃS, G.; MELÉ, E.; SERRA, J.; SALVIA, J.; PLA, M.; NADAL, A.; MESSEGUER, J. Effect of volunteers on maize gene flow. **Transgenic Research**, v. 18 (4), p. 583-594, 2009.

PEREIRA, I. M.; ALVARENGA, A. P.; BOTELHO, S. A. Banco de sementes do solo, como subsídio à recomposição de mata ciliar. **Floresta**, v. 40, n. 4, p. 721-730, 2010.

RIESGO, L.; AREAL, F. J.; SANVIDO, O.; RODRIGUEZ - CERESO, E. Distances needed to limit cross-fertilization between GM and conventional maize in Europe. **Nature Biotechnology**, v.28(8), p.780-783, 2010.

ŠUŠTAR-VOZLIČ, J.; ROSTOHAR, K.; BLEJEC, A.; KOZJAK, P.; ČERGAN, Z.; MEGLIČ, V. Development of sampling approaches for the determination of the presence of genetically modified organisms at the field level. **Anal Bioanal Chem**, p. 396, p. 2031–2041, 2010.

VIAUD, V.; MONOD, H.; LAVIGNE, C.; ANGEVIN, F.; ADAMCZYK, K. Spatial sensitivity of maize gene-flow to landscape pattern: a simulation approach. **Landscape Ecology**, v. 23, p. 1067-1079, 2008.

VILJOEN, C.; CHETTY, L. A case study of GM maize gene flow in South Africa. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, p. 1-8, 2011

VOGLER, A.; EISENBEISS, H.; AULINGER-LEIPNER, I.; STAMP, P. Impact of topography on cross-pollination in maize (*Zea mays* L.). **Europ. J. Agronomy**, v.31, p. 99–102, 2009.

ZHANG, K ; LI, Y ; LIAN, L. Pollen mediated transgene flow in maize grown in the Huang-huai-hai region in China. **The Journal of Agricultural Science**, v.149(2), p.205-216, 2011.

CAPÍTULO 3 Detecção de eventos transgênicos de milho por meio do teste de tiras imunocromatográficas e do PCR convencional

RESUMO

Com o crescimento do mercado de transgênicos, fazem-se necessárias metodologias rápidas e economicamente viáveis para a realização dos testes para a detecção de transgenes, tanto para a identificação de contaminação em sementes quanto em grãos, para fins de comercialização. O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de milho GNZ 2004 convencional, VT-Pro (MON89034), Round up Ready - RR (NK603) e Herculex (TC1507). Com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (VT-Pro, RR e Herculex) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 0,2%, 0,4%, 1,0% e 1,6%, para VT-Pro e 0,2%, 0,5%, 0,8% e 1,2%, para RR e Herculex. Foram separados o endosperma e o embrião das sementes de milho, depois de elas terem sido embebidas, por 5 horas, em água. O teste de tiras foi realizado em semente inteira (SI), endosperma (E) e embrião (EE). Para a avaliação da especificidade da técnica na detecção do evento TC1507, nome comercial Herculex, da empresa Bayer Cropscience, por meio da técnica de PCR convencional, foram utilizadas, como controle negativo, sementes do híbrido comercial de milho GNZ 2004 e, como controle positivo, o híbrido de milho 2B655Hx da empresa Dow Agriscience. Com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (TC1507) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 1 em 10 (10%), 1 em 20 (5%), 1 em 100 (1%), 1 em 200 (0,5%) e 1 em 1000 (0,1%). Sementes de cada amostra foram trituradas em moinho refrigerado e, em seguida, foi realizada a extração do DNA, pelo método CTAB 2%. Utilizando-se a tira imunocromatográfica, foi possível avaliar a expressão de proteínas referente aos eventos VT-Pro, RR e Herculex, quando da utilização de sementes inteiras com níveis de contaminação de 0,2% e, independente do evento analisado pelo teste da tira imunocromatográfica e do nível de contaminação testado, o melhor material para a detecção dos eventos foi a semente inteira. Foi possível, pela técnica de PCR convencional, detectar o evento TC1507 em amostras com 1% de contaminação.

Palavras Chave: Testes Rápidos. Contaminação. Especificidade.

ABSTRACT

With the growing of transgenic market, are necessary fast methodologies and economically viable for the tests for the transgenes detection, both for the contamination identification in seeds and grains, for marketing purposes. The work was performed at the Central Laboratory of Seeds - UFLA. Seeds of commercial maize cultivars were used GNZ 2004 conventional, and transgenics VT-Pro (MON89034), Round up Ready (NK603) and Herculex (TC1507) were used. In order to simulate different contamination levels, transgenic seeds (VT-Pro, Round up Ready and Herculex) were mixed to conventional seeds in levels of 0.2%, 0.4%, 1.0% and 1.6%, for VT-Pro and 0.2%, 0.5%, 0.8% and 1.2% for Round up Ready and Herculex. The endosperm and the embryo were separated from the corn seeds, after they have been embedded for 5 hours in water. The lateral flow membrane strip test was performed in whole seed (WS), endosperm (E) and embryo (EE). For the evaluation of the technique specificity in the event detection TC1507, Herculex trade name from Bayer CropScience, by conventional PCR were used as negative control, seeds of commercial maize hybrid GNZ 2004 and as positive control, the mayze hybrid 2B655Hx from Dow Agrosience. In order to stimulate different contamination levels, transgenic seeds (TC1507) were mixed to conventional seeds at levels of 1 in 10 (10%), 1 in 20 (5%), 1 in 100 (1%), 1 in 200 (0.5%) and 1 in 1000 (0.1%). Seeds from each sample were crushed in refrigerated mill, and then was performed DNA extraction by CTAB 2% method. Using the lateral flow membrane strip, it was possible to evaluate the expression of proteins related to the events VT-Pro, Round up Ready and Herculex, when whole seeds were used, in contamination levels of 0.2% and independent of analyzed event by the lateral flow membrane strip test and the contamination level tested, the best material for the events detection was the whole seed. It was possible, by conventional PCR, detect the event TC1507 in samples with 1% of contamination.

Key words: Fast Tests. Contamination. Specificity.

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2011, foram cultivados 160 milhões de hectares de lavouras com culturas transgênicas no mundo, com crescimento de 12 milhões de hectares em relação ao ano de 2010 (James, 2012).

O cenário de crescimento da adoção da tecnologia não poderia ser diferente no Brasil, que é o segundo país do mundo em área plantada com OGM. Em 2011, foram cultivados, no Brasil, 30,3 milhões de hectares de lavouras transgênicas, com crescimento de 20% em relação a 2010, confirmando seu lugar no ranking dos países que mais utilizam a tecnologia dos organismos geneticamente modificados, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que cultivaram 69 milhões de hectares. Dos 30,3 milhões de hectares de lavouras OGM no Brasil, 9,91 milhões foram cultivados com milho OGM, o que correspondeu a 64,9% de toda área plantada com milho no país (James, 2012).

Com o crescimento do mercado de transgênicos, é necessário o desenvolvimento de metodologias rápidas e economicamente viáveis para a realização dos testes para a detecção de transgenes, tanto para a identificação de contaminação em sementes quanto em grãos para fins de comercialização. As técnicas que têm sido mais utilizadas para o diagnóstico da presença de transgenes são a imunocromatografia, que consiste em uma metodologia simples, que não necessita de aparelhos específicos e de mão de obra especializada e a PCR, que identifica no genoma da planta a presença do gene exógeno, sendo uma técnica bastante difundida em todo o mundo.

A tira imunocromatográfica é um método de detecção indireto, pois por meio dela é identificada a proteína produzida pelo gene e não o gene em si, sendo também um teste em que se identifica, geralmente, a presença ou a ausência dessa proteína.

A detecção da proteína proveniente da transformação genética utilizando a tira imunocromatográfica é baseada em um complexo de anticorpos fixados à tira que são capazes de reconhecer essa proteína. A tira possui anticorpos específicos para a proteína e estes são acoplados a um reagente colorido e incorporados a ela. Esse complexo anticorpo-corante se liga, então, às proteínas-alvo. Quando a tira entra em contato com o extrato que contenha a proteína, forma-se um complexo proteína-anticorpo. Este complexo colorido flui por capilaridade através da tira, que tem duas zonas de captura, uma específica para a proteína alvo e a outra específica para o anticorpo de detecção. O anticorpo de detecção, que não se liga à proteína, continua fluindo em direção à parte superior da tira. A presença de apenas uma linha, linha de controle, na membrana, indica um resultado negativo, enquanto o aparecimento duas linhas indica que a amostra é positiva. Nesse teste, o resultado é observado rapidamente, no tempo de 5 a 10 minutos (Nascimento et al., 2012).

O teste de tiras apresenta vantagens, desde que sejam considerados os fatores que podem interferir no resultado do mesmo, a exemplo do nível de expressão da proteína em sementes e grãos. Em milho, os tecidos das sementes têm diferentes níveis de ploidia. O embrião é $2n$, sendo metade proveniente do pai e metade da mãe; o endosperma é $3n$, em que $2n$ é proveniente da mãe e $1n$ do pai, e o tegumento é $2n$, tecido materno derivado do óvulo. Assim, o nível de expressão dessas proteínas pode ser influenciado pelo parental no qual o gene foi inserido e, por consequência, influenciar na detecção do evento (International Seed Testing Association - ISTA, 2009).

Contudo, os testes baseados em proteínas não são indicados em casos em que a proteína, por algum motivo, não está sendo expressa no tecido vegetal mas o gene exógeno esteja presente em seu genoma. Nesses casos em que há a necessidade de analisar diretamente o gene inserido, a PCR tem sido a técnica mais utilizada, entre todas as outras baseadas em DNA (Marmioli et al., 2008).

A análise de OGM por meio da técnica de PCR necessita da presença de pelo menos dois pares de *primers*: um que identifica um gene constitutivo da espécie e outro que identifica o gene específico introduzido pela transformação genética (Elenis et al., 2008). O controle endógeno permite controlar a eficiência da reação; quando este é amplificado, tem-se a confirmação de que a reação está ocorrendo corretamente. O *primer* específico do evento indica a presença do gene transgênico no genoma analisado. Na PCR convencional é analisada a presença do gene qualitativamente, por meio da presença ou da ausência do mesmo (Gryson, 2010), assim como na tira imunocromatográfica.

O mais importante quando se utiliza um novo *primer* na rotina de um laboratório é o conhecimento de sua sensibilidade e saber se esta atende aos padrões desejados. Levando em consideração a legislação brasileira vigente para grãos, o *primer* deve ser capaz de identificar pelo menos 1% de contaminação por transgênico no material convencional, pois a rotulagem de alimento tem esse percentual como limite para a identificação de produtos que contenham traços de transgênicos.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a detecção da expressão de proteínas do evento VT-Pro em lotes de grãos de milho contendo os níveis de contaminação de 0,2%, 0,4%, 1,0% e 1,6% e de 0,2%, 0,5%, 0,8% e 1,2%, para os eventos RR e Herculex no endosperma, no embrião e na semente inteira. Objetivou-se também verificar a sensibilidade do *primer* para a identificação do evento TC1507 em sementes de milho, utilizando os níveis de contaminação de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0% e 10%.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Teste de tiras imunocromatográficas

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, devidamente habilitado, conforme os requisitos da NBR ISO/IEC 17025:2005 e credenciado no MAPA para análise de sementes transgênicas. Foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de milho GNZ 2004 convencional, VT-Pro (MON89034), Round up Ready - RR (NK603) e Herculex (TC1507). Com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (VT-Pro, RR e Herculex) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 0,2%, 0,4%, 1,0% e 1,6%, para VT-Pro e 0,2%, 0,5%, 0,8% e 1,2%, para RR e Herculex. Estas proporções foram definidas a partir das especificações do kit comercial da marca Enviroligix®, com limite de detecção de 1,0% para o evento VT-Pro e 0,5% para os eventos RR e Herculex.

Antes da realização do teste de tiras foram separados os tecidos das sementes, a fim de se verificar o nível de expressão das proteínas nos tecidos. Foram separados o endosperma e o embrião das sementes de milho, após estas serem embebidas, por 5 horas, em água. O teste foi realizado em semente inteira (SI), endosperma (E) e embrião (EE).

O teste foi realizado seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante. Foram utilizadas 500 sementes trituradas por 60 segundos. Foi adicionado ao milho triturado 1,5x seu peso de água, seguindo-se com agitação da amostra. Foram pipetados 0,5 mL do sobrenadante, o qual foi acondicionado no tubo de reação em que foi inserida a tira. Após 10 minutos, foram analisados os resultados. Para cada evento foram utilizadas, como controle positivo, sementes transgênicas e, como controle negativo, sementes convencionais.

2.2 PCR multiplex

Para a avaliação da especificidade da técnica na detecção do evento TC1507, nome comercial Herculex, da empresa Bayer Cropscience, foram utilizadas, como controle negativo, sementes do híbrido comercial de milho GNZ 2004 e, como controle positivo, o híbrido de milho 2B655Hx da empresa Dow Agrosience. Com a finalidade de simular diferentes níveis de contaminação, sementes transgênicas (TC1507) foram misturadas às sementes convencionais, nos níveis de 1 em 10 (10%), 1 em 20 (5%), 1 em 100 (1%), 1 em 200 (0,5%) e 1 em 1000 (0,1%). Sementes de cada amostra foram trituradas em moinho refrigerado e, em seguida, foi realizada a extração do DNA.

Para a extração, foram adicionados, a 50 mg da amostra macerada, 620 μ L do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 5 M NaCl), com adição de 2% de β -mercaptoetanol e incubando-se, a 65 °C, por 60 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 600 μ L de mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram levemente agitados por 5 minutos, para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada, a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o procedimento anterior foi repetido. Em seguida, foi adicionado isopropanol gelado, na proporção de 1:1 e centrifugou-se, a 14.000 rpm, por 6 minutos e, posteriormente, lavou-se duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Após a secagem à temperatura ambiente, o DNA foi ressuscitado em 50 μ L de água ultrapura pH8,0 (Ferreira e Grattapaglia modificado, 1998). Ao final da extração, adicionaram-se 2 μ L de RNase, seguindo-se incubação, a 37 °C, por trinta minutos. A quantificação do DNA foi avaliada pela medida da absorbância a 260/280 nm em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e em gel de agarose 0,8%.

Para a detecção qualitativa do evento transgênico foi realizada a PCR utilizando-se *primers* específicos para o evento TC1507 (Lee et al., 2004) e para o gene zeína como controle endógeno (Nascimento et al., 2012), como se observa na Tabela 1.

As reações de PCR consistiram de 100 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 µM de dNTP, 50 mM MgCl² e 2,5 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25 µL. As amplificações foram realizadas com uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, seguida por 5 ciclos de 62 °C, por 20 segundos, com decréscimo de 1 °C por ciclo e 72 °C, por 30 segundos; 30 ciclos de 59 °C, por 20 segundos e 72 °C, por 30 segundos, além de uma etapa final de 72 °C, por 5 minutos.

Tabela 1 Relação dos *primers* utilizados no sistema PCR. UFLA, Lavras, MG, 2012

<i>Primer</i>	<i>Nome</i>	<i>Sequência</i>	<i>Pares de bases</i>
Zeína	Zeí 1-5'	CCT CAG TCG CAC ATA TCT ACT ATA CT	508
	Zeí 1-3'	CTA GAA TGC AGC ACC AAC AAA	
Herculex	TC-F195	CTG CCT TCA TAC GCT ATT TAT TTG C	251
	TC-R445	GGA ACA AAC TCA GAC AAC AGG AAA C	

O par de *primers* utilizado para a identificação do evento TC1507 (TC-F195 e TC-R445) se anela na região do promotor ubiquitina (MubG1) e do gene Cry1F baseado no banco de sequências (Acessos no GeneBank: U29159 e M73254) (Lee et al., 2004), como pode ser observado na Figura 1.

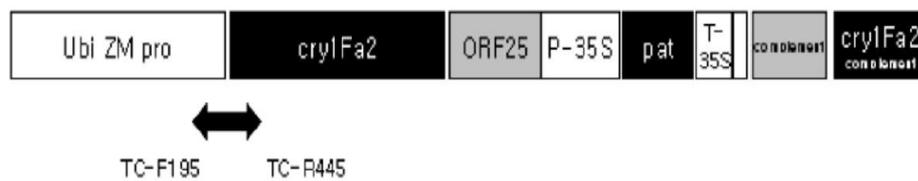


Figura 1 Diagrama esquemático da localização do par de *primers* da PCR para a detecção do evento TC1507 (Lee et al., 2004)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de tiras imunocromatográficas

A expressão da proteína para o evento MON89034, no nível de detecção de 1%, valor recomendado pelo fabricante, não foi observada apenas no embrião. Quando da utilização de embriões, a expressão da proteína foi observada em lotes de sementes de milho contendo 1,6% de contaminação (Tabela 2). Quando se utilizaram sementes inteiras, foi detectada a expressão da proteína em todos os níveis de contaminação. Assim, infere-se que é possível detectar a expressão de proteínas relacionadas a esse gene em níveis inferiores aos sugeridos pela empresa. Também se pode concluir que o transgene foi inserido no parental feminino, visto que foi necessária a junção da quantidade de proteínas produzidas pelo embrião e pelo endosperma, na semente inteira, para que houvesse a detecção do evento, em níveis abaixo do sugerido pela empresa, e que a detecção no embrião só foi possível em quantidade de contaminação superior à recomendada pela empresa.

Tabela 2 Resultado do teste de tiras imunocromatográficas da proteína Cry2Ab – Evento MON89034 (VT-Pro). UFLA, Lavras, MG, 2012

Material	Nível de contaminação (%)			
	0,2	0,4	1,0*	1,6
E	-	-	+	+
EE	-	-	-	+
SI	+	+	+	+

*Limite de detecção para o evento, de acordo com as especificações técnicas do kit.

Os resultados de detecção de expressão de proteínas correspondentes aos eventos TC1507 e NK603 foram semelhantes entre si, com exceção da ausência de expressão da proteína nos níveis de contaminação 0,8% e 1,2%, no endosperma, para o evento TC1507 (Tabela 3). Para o evento NK603, a partir do

nível de contaminação de 0,8%, foi observada a expressão da proteína em todos os materiais (Tabela 4).

Por meio dos resultados obtidos infere-se que o transgene foi inserido no parental masculino, uma vez que a menor expressão de proteínas foi observada no endosperma, havendo a necessidade de aumentar o nível de contaminação para a detecção da proteína, uma vez que o endosperma possui 1n do parental masculino e 2n do parental feminino.

Em ambos os eventos, mesmo em lotes com o menor nível de contaminação, de 0,2%, foi possível a detecção da expressão das proteínas quando da utilização de sementes inteiras. Provavelmente, as empresas adotam os níveis de detecção apresentados no kit para maior segurança, evitando-se, de alguma forma, resultados falsos negativos.

Tabela 3 Resultado do teste de tiras imunocromatográficas da proteína Cry1F – Evento TC1507 (Herculex). UFLA, Lavras, MG, 2012

Material	Nível de contaminação (%)			
	0,2	0,5*	0,8	1,2
E	-	-	-	-
EE	+	+	+	+
SI	+	+	+	+

*Limite de detecção para o evento, de acordo com as especificações técnicas do kit.

Tabela 4 Resultado do teste de tiras imunocromatográficas da proteína CP4EPSPS – Evento NK603 (Round up Ready). UFLA, Lavras, MG, 2012

Material	Nível de contaminação (%)			
	0,2	0,5*	0,8	1,2
E	-	-	+	+
EE	+	+	+	+
SI	+	+	+	+

*Limite de detecção para o evento, de acordo com as especificações técnicas do kit.

3.2 PCR multiplex

Antes das reações foram realizados testes para identificar a melhor concentração de DNA na reação. Foram testadas três concentrações: 10, 50 e 100 ng de DNA. A partir de 50 ng ocorreu amplificação, porém, ela foi visualizada mais claramente na concentração de 100 ng.

Em todas as amostras analisadas ocorreu a amplificação do controle endógeno – zeína, indicando a eficiência da reação. Dentre as amostras avaliadas, somente a partir de 1% de contaminação foi possível observar a banda específica do *primer* para o evento TC1507 (Figura 3). Lee et al. (2004), utilizando o mesmo *primer*, conseguiram observar a presença do evento, mesmo em amostras com baixíssimo percentual de contaminação, como, por exemplo, 0,01%. A diferença entre os resultados encontrados pode ser explicada pela grande quantidade de variáveis envolvidas no processo, sendo a extração de DNA considerada um passo crítico durante o processo de PCR (Marmioli et al., 2008), pois interfere diretamente na qualidade da mesma.

O DNA analisado foi extraído a partir de sementes, que são estruturas vegetais ricas em carboidratos, lipídios e proteínas que, muitas vezes, dificultam o isolamento do DNA, exigindo maior número de lavagens com solvente orgânico, clorofórmio-álcool isolamílico. Essas lavagens implicam em redução na quantidade e na qualidade do DNA, pois parte dessas moléculas não se separa de outros compostos orgânicos e é, conseqüentemente, descartada (Nascimento et al., 2012), podendo ocorrer também a contaminação dele por compostos fenólicos. Sendo assim, a quantificação e a identificação de OGMs por meio da técnica de PCR dependem diretamente da qualidade e da quantidade do DNA utilizado (Gryson, 2010).

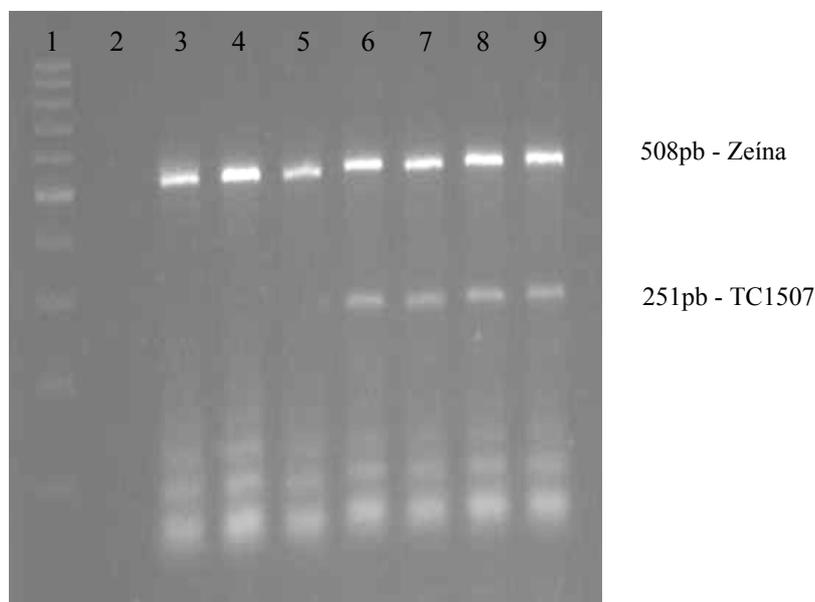


Figura 2 Resultado de sensibilidade da PCR para o evento TC1507. Linhas 1-9: padrão de DNA de 100 pb, controle negativo, amostra de milho convencional, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0% e 10,0% de contaminação com milho transgênico TC1507 e amostra de TC1507.

Apesar de a técnica de PCR em tempo real ter custo mais elevado, sua sensibilidade e rapidez são muito maiores, quando comparadas às do PCR convencional (Wang et al., 2012). Para testes que necessitam de mais precisão, o PCR em tempo real é o mais indicado, em relação ao PCR convencional.

O ideal com relação aos marcadores de identificação de transgênicos é que eles sejam tão sensíveis quanto possível, pois, em outros países, existem padrões mais rígidos de contaminação, a exemplo de países da União Europeia, onde o padrão é de 0,9%. Neste caso, métodos mais precisos de detecção são necessários e isso causa impacto nos produtos brasileiros, quando são exportados para países que utilizam limites mais rígidos. O ideal seria a utilização de padrões globalizados, a fim de facilitar as transações de importações e exportações.

Novas técnicas de detecção de OGM vêm sendo descritas e várias ainda estão sendo desenvolvidas. A utilização de novas técnicas na rotina dos laboratórios depende de muitos fatores, tais como custo e adaptabilidade a essas novas técnicas (Querci et al., 2010 e Elsanhoty et al., 2011). Devido a isso, a maioria dos laboratórios continua utilizando o método da PCR convencional (Querci et al., 2010).

CONCLUSÕES

Independente do evento analisado pelo teste de tira imunocromatográfica e do nível de contaminação testado, o melhor tecido para a detecção do evento foi semente inteira.

É possível avaliar a expressão de proteínas referente aos eventos VT-Pro, RR e Herculex, quando da utilização de sementes inteiras com níveis de contaminação a partir de 0,2%.

É possível, pela técnica de PCR, detectar o evento TC1507 em amostras com, no mínimo, 1% de contaminação.

REFERÊNCIAS

ELSANHOTY, R. M.; RAMADAN, M. F.; JANY, K. D. DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 126, pag. 1883–1889, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso demarcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília:EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

GRYSON, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, pag. 2003–2022, 2010.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Position Paper on ISTA's view regarding the units for the reporting of quantitative results on presence of seeds with specified traits in conventional seed lots**. Switzerland, 2009. p. 4. Document 08-2009.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Brief 43-2011: Status Global das Variedades Transgênicas/Biotecnológicas Comerciais: 2011**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/highlights/pdf/Brief%2043%20-%20Highlights%20-%20Portuguese.pdf>>. Acesso em 1 de Maio de 2012.

LEE, S. H.; PARK, Y. H.; KIM, J. K.; PARK, K. W.; KIM, Y. M. Qualitative PCR Method for Detection of Genetically Modified Maize Lines NK603 and TC1507. **Agric. Chem. Biotechnol**, v. 47(4), pag. 185-188, 2004.

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E.; GULLÌ, M.; MALCEVSCHI, A.; PEANO, C.; BORDONI, R.; DE BELLIS, G. Methods for detection of GMOs in food and feed. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, pag. 369–384, 2008.

NASCIMENTO, V. E.; VON PINHO, E. V. R.; VON PINHO, R. G.; SOUZA, J. C.; JÚNIOR, A. D. N. Detection limits of the strip test and PCR for genetically modified corn in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2497-2505, 2012.

QUERCI, M.; BULCKE, M. V. D.; ŽEL, J.; EEDE, G. V. D.; BROLL, H. New approaches in GMO detection. **Anal Bioanal Chem**, v. 39, pag. 1991–2002, 2010.

WANG, X.; TENG, D.; TIAN, F.; GUAN, Q.; WANG, J. Comparison of Three DNA Extraction Methods for Feed Products and Four Amplification Methods for the 5'-Junction Fragment of Roundup Ready Soybean. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, pag. 4586–4595, 2012.